

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Simona Baluchová

KYSELINA VANILMANDL'OVÁ A HOMO VANILOVÁ:
ELEKTROANALÝZA NA ELEKTRÓDACH NA BÁZE
UHLÍKU

Vanillylmandelic and Homovanillic Acid: Electroanalysis
at Carbon-Based Electrodes

Diplomová práce

Vedoucí práce: RNDr. Karolina Schwarzová, Ph.D.

Praha 2017

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 16. května 2017.

Táto práca bola finančne podporená Grantovou agentúrou Českej republiky (projekt GAČR P206/15/02815S).

Úvodom by som rada poďakovala svojej školiteľke RNDr. Karoline Schwarzovej, Ph.D. za všetku pomoc pri vypracovávaní predkladanej práce, venovaný čas, cenné rady a pripomienky a vynikajúci prístup, ktorý si veľmi vážim. Veľká vďaka patrí aj Prof. RNDr. Jiřímu Barekovi, CSc. za podporu a povzbudzovanie pri rozvíjaní mojej začínajúcej bádateľskej dráhy.

Rodičom nesmierne ďakujem nielen za samotné umožnenie štúdia, ale aj za to, že mi boli a sú obrovskou oporou pri napĺňaní mojich cieľov a snov.

Predmetové heslá: analytická chémia
elektrochémia
tumorové markery

Kľúčové slová: bórom dopovaný diamant
kyselina homovanilová
kyselina vanilmandľová
sklený uhlík
voltametria

Objective words: analytical chemistry
electrochemistry
tumor markers

Key words: boron doped diamond
glassy carbon
homovanillic acid
vanillylmandelic acid
voltammetry

ABSTRAKT

Predmetom predkladanej diplomovej práce je štúdium elektrochemického správania dvoch významných diagnostických markerov, kyseliny vanilmandľovej (VMA) a kyseliny homovanilovej (HVA), na elektródach na báze uhlíku s využitím cyklickej a diferenčnej pulznej voltametrie. Bolo prevedené vzájomné porovnanie elektródy zo skleného uhlíku (GCE) a GCE modifikovanej mnohostenovými uhlíkovými nanotrubičkami, Nafionom (Nafion/GCE) a polymérom neutrálnej červene (PNR/GCE), bórom dopovanej diamantovej (BDD) elektródy, ktorá bola aktivovaná anodicky ($E_{akt} = +2,4 \text{ V}$, $t = 30 \text{ s}$) alebo leštením na alumine. Výrazné rozdiely vo voltametrických odozvách VMA a HVA sú nachádzané nielen medzi používanými elektródovými materiálmi, ktoré ovplyvňujú i spôsob riadenia oxidačného procesu látok, ale i v závislosti na pH prostredia, v ktorom sa tieto kyseliny vyskytujú. Najvyhovujúcejšie pre ich stanovenie je kyslé prostredie. Kalibračné závislosti boli namerané v $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ fosfátovom pufrí o pH 3,0, ktorý bol zvolený ako optimálny pre stanovenie metódou diferenčnej pulznej voltametrie. Dosiahnuté limity detekcie pre HVA sú $0,6 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ na BDD elektróde, $0,9 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ na nemodifikovanej GC elektróde, $0,8 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ na Nafion/GCE a $1,2 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ na PNR/GCE. V prípade VMA tieto hodnoty činia $0,4 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ na BDD elektróde, $1,5 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ na nemodifikovanej GC elektróde, $2,4 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ na Nafion/GCE a $1,1 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ na PNR/GCE. Limity kvantifikácie sú pre obe látky na všetkých elektródach postačujúce pre ich analýzu v moči. Možnosť ich súčasného stanovenia v zmesi bola taktiež preverená. Anodicky aktivovaná bórom dopovaná diamantová elektróda bola aplikovaná na reálne vzorky moču, priamo i po predchádzajúcej extrakcii na tuhej fáze využitím vopred zoptimalizovaného postupu.

ABSTRACT

The objective of the present work is the study of the electrochemical behaviour of two diagnostic tumor markers of great importance, vanillylmandelic acid (VMA) and homovanillic acid (HVA), on carbon-based electrodes by using cyclic and differential pulse voltammetry. A comparison was made among non-modified glassy carbon electrode (GCE) and GCE modified by multi-walled carbon nanotubes, Nafion (Nafion/GCE) and poly(neutral red) (PNR/GCE), and further boron doped diamond (BDD) electrode which was activated by anodic polarization ($E_{\text{akt}} = +2,4 \text{ V}$, $t = 30 \text{ s}$) or by polishing on alumina slurry. Significant differences in the voltammetric responses of VMA and HVA were found, not only among utilized electrode materials which also influenced the way of controlling the oxidation process, but also they depend on the pH value of aqueous media in which these acids occurred. An acidic environment is the most suitable for their determination. Calibration dependences were measured in $0.1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ phosphate buffer pH 3.0 which was chosen as an optimal supporting electrolyte for differential pulse voltammetric determination. Achieved detection limits were 0.6, 0.9, 0.8 and $1.2 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ for HVA and 0.4, 1.5, 2.4 and $1.1 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ for VMA at BDD electrode, non-modified GCE, Nafion/GCE and PNR/GCE, respectively. Limits of quantification for both organic compounds on all tested electrode materials are sufficient for their analysis in urine. Verification of the possibility of simultaneous determination of the studied compounds in mixture was also carried out. Anodically oxidized boron-doped diamond electrode was applied for measurements in real urine samples directly and after solid phase extraction by using a pre-optimized procedure.

OBSAH

1	TEORETICKÁ ČASŤ	11
1.1	Cieľ práce	11
1.2	Študované látky	11
1.2.1	Metódy stanovenia	12
1.2.2	Mechanizmus elektrochemickej oxidácie HVA a VMA.....	14
1.3	Elektrodové materiály na báze uhlíku	15
1.3.1	Bórom dopovaný diamant	16
1.3.2	Sklený uhlík.....	19
1.3.3	Elektroanalýza fenolických látok	24
2	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	26
2.1	Reagencie a príprava roztokov	26
2.2	Prístrojové vybavenie	27
2.3	Pracovné postupy.....	28
2.3.1	Postup voltametrických meraní	28
2.3.2	Príprava modifikovaných GC elektród	29
2.3.3	Postup extrakcie na tuhej fáze	31
2.3.4	Spôsoby vyhodnotenia voltametrických kriviek	31
2.3.5	Štatistické vyhodnotenie nameraných dát	32
3	VÝSLEDKY A DISKUSIA	33
3.1	Elektrochemická charakterizácia elektród	33
3.2	Optimalizácia aktivácie elektród v prítomnosti HVA a VMA	37
	3.2.1 Vplyv pH prostredia a doby leštenia povrchu BDD elektródy na alumine na voltametrickú odozvu HVA a VMA	42

3.3	Vplyv pH na elektrochemické správanie HVA a VMA na GC elektróde	47
3.4	Voltametrické štúdium HVA a VMA na modifikovaných GC elektródach.....	55
3.5	Cyklická voltametria: riadenie oxidácie HVA a VMA	59
3.6	Kalibračné závislosti, určenie LOD a LOQ.....	67
3.7	Voltametrické stanovenie HVA a VMA v zmesi a vo vzorkách moču....	74
3.7.1	Extrakcie na tuhej fáze z moču	75
4	ZÁVER.....	78
5	LITERATÚRA.....	83

ZOZNAM SKRATIEK A SYMBOLOV

BDD	bórom dopovaný diamant
BR	Brittonov – Robinsonov pufor
c	molárna koncentrácia
CV	cyklická voltametria
DMF	dimetylformamid
DPV	diferenčná pulzná voltametria
E	potenciál
E_{akt}	potenciál aktivácie
E_p	potenciál píku
ΔE_p	rozdiel potenciálov anodického a katodického píku
GC	sklený uhlík
GCE	elektroda zo skleného uhlíku
H-BDD	hydrogenovaný bórom dopovaný diamant
HVA	kyselina homovanilová
i	prúdová hustota
I	prúd
I_A	anodický prúd
I_K	katodický prúd
i_p	prúdová hustota píku
I_p	prúd píku
$L_{1,2}$	interval spoľahlivosti
LOD	limit detekcie
LOQ	limit kvantifikácie
MWCNTs	mnohostenové uhlíkové nanotrubičky (multi-walled carbon nanotubes)
n	počet meraní
NR	neutrálna červeň
O-BDD	oxidovaný bórom dopovaný diamant
pH	záporný dekadický logaritmus aktivity vodíkových katiónov
pK_a	záporný dekadický logaritmus kyslej disociačnej konštanty

PNR	polymér neutrálnej červene
R	korelačný koeficient
s_r	relatívna smerodajná odchýlka
SPE	extrakcia na tuhej fáze
t	čas
v	rýchlosť polarizácie elektródy
VMA	kyselina vanilmandľová

1 TEORETICKÁ ČASŤ

1.1 Cieľ práce

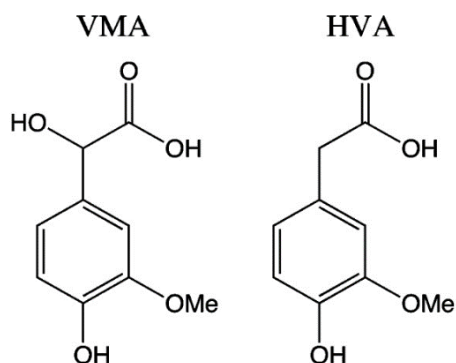
Hlavným predmetom skúmania tejto práce je štúdium elektrochemickej oxidácie dvoch dôležitých klinických markerov, kyseliny vanilmandľovej (VMA) a kyseliny homovanilovej (HVA), na uhlíkových elektródach na báze nemodifikovaného a modifikovaného skleného uhlíku (GC) a bórom dopovaného diamantu (BDD), vzájomné porovnanie elektród a ich využitie pre vývoj voltametrických metód pre kvantifikáciu uvedených analytov. Ďalej bola preverená možnosť súčasného stanovenia študovaných kyselín v zmesi a v reálnych vzorkách moču priamo, a po predchádzajúcej extrakcii na tuhej fáze.

Predkladaná práca nadväzuje na bakalársku prácu autorky¹, v rámci ktorej bol prevedený základný výskum elektrochemického správania HVA a VMA na anodicky aktivovanej BDD elektróde.

1.2 Študované látky

Klinická chémia využíva ako diagnostické markery pre rôznorodé metabolické² a neurologické^{3, 4} poruchy hlavné konečné metabolity katecholamínov⁵, kyselinu vanilmandľovú a kyselinu homovanilovú.

Obe organické kyseliny (**Obr. 1.1**) reprezentujú dva zásadné biomarkery neuroblastomy^{3, 6}, tretieho najčastejšie sa vyskytujúceho typu rakoviny u detí do veku piatich rokov⁷. U dospelých jedincov je najzávažnejší neuroendokrinný tumor zahŕňajúci nadprodukciu VMA a HVA feochromocytoma^{4, 8}, ktorej výskyt je najviac rozšírený medzi 40. – 50. rokom života.



Obr. 1.1 Chemická štruktúra kyseliny vanilmandľovej a kyseliny homovanilovej.

Fyziologické rozmedzia koncentrácií týchto látok v krvnej plazme sa spravidla pohybujú medzi $(2,8 - 5,8) \cdot 10^{-2} \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ v prípade HVA a $(2,2 - 7,4) \cdot 10^{-2} \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ u VMA⁹, v moči sú ich fyziologické hladiny vyššie, pohybujú sa na úrovni $7,1 - 41,7 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ u HVA a $6,6 - 38,4 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ u VMA¹⁰. Pomer ich koncentrácií vo fyziologických tekutinách môže byť taktiež využitý k diagnostike jednotlivých ochorení².

Tumory v sympatickom nervovom systéme sú príčinou nadmernej produkcie katecholamínov, čo vedie k zvýšenému uvoľňovaniu odpovedajúcich metabolitov do krvi a ich následnej exkrécii do moču¹¹. Práve z tohto dôvodu sú HVA a VMA testované v moči predovšetkým pre diagnózu zmienených nádorov, pre sledovanie odpovede organizmu na liečbu a určovanie prognózy, koncentračné hladiny oboch látok môžu byť v korelácii so štádiom príslušného ochorenia.

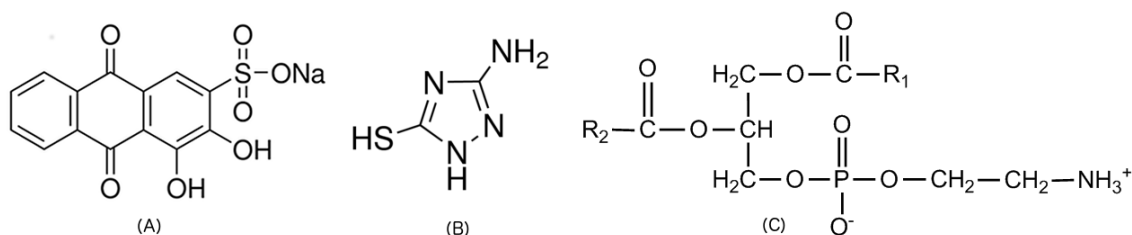
1.2.1 Metódy stanovenia

Bolo vyvinutých množstvo tradičných analytických postupov pre detekciu a kvantifikáciu VMA a HVA, prípadne i separáciu, ich podrobný súhrn po rok 2015 je uvedený v bakalárskej práci¹. Za uplynulé dva roky bola vyvinutá nová metóda, využívajúca disperznú mikroextrakciu kvapalina-kvapalina nasledovanú hydrofilnou interakčnou kvapalinovou chromatografiou (HILIC) v spojení s hmotnostným spektrometrom, pre simultánne stanovenie vybraných neuromediátorov a ich metabolitov, vrátane HVA a VMA¹². Taktiež došlo k vývoju nového diagnostického nástroja na báze polymérneho filmu pripraveného z Trögerovej bázy deponovaného

na vodivý podklad za využitia elektrochemickej polymerizácie, pričom tento senzor umožňuje čisto potenciometrickú detekciu VMA¹³.

Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia v spojení s elektrochemickým detektorom je bežne používaná metóda pre stanovenie oboch metabolitov po ich predchádzajúcej extrakcii na tuhej fáze (SPE)¹¹. Avšak zvýšený záujem nielen o ich rutinnú analýzu, ale aj o masový skrining neuroblastomy v rannom detstve, vedie k vývoju rýchlych, lacných, selektívnych a citlivých elektrochemických metód, ktorými je možné previesť jednoduchú a spoľahlivú analýzu príslušných biologických matric.

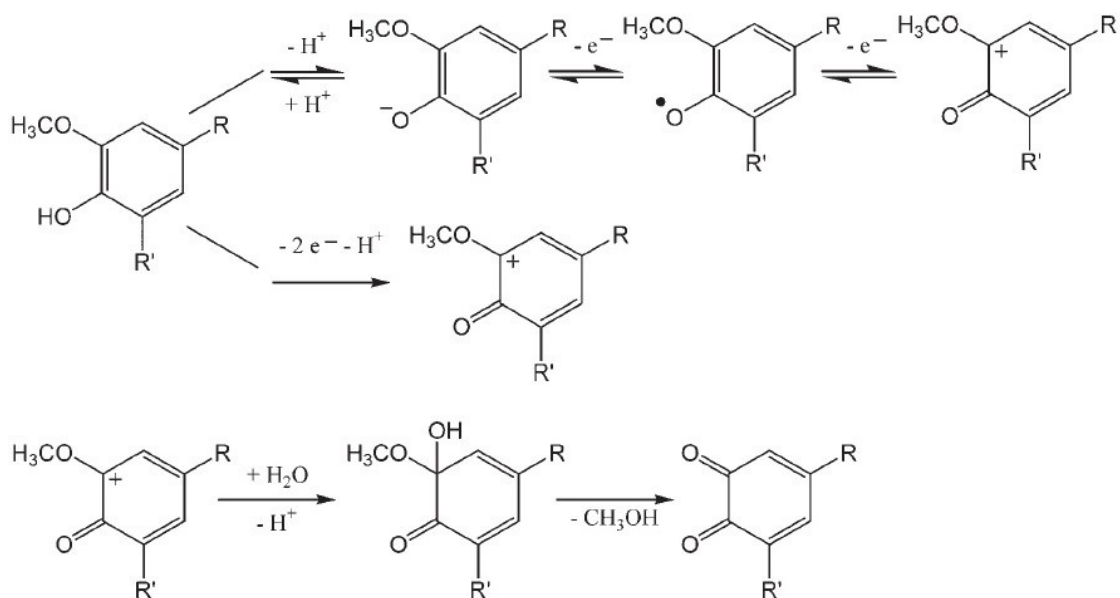
VMA a HVA sú elektroaktívne, štruktúrou veľmi obdobné, fenolické karboxylové kyseliny (**Obr. 1.1**). Anodická oxidácia je umožnená prítomnosťou hydroxylovej skupiny viazanej na aromatický skelet. Ich kvantifikáciu je možné previesť elektroanalytickými technikami využívajúc pracovné elektródy na báze uhlíku ako je pyrolytický grafit¹⁴, sklený uhlík¹⁵, kompozitné filmové¹⁶ či sieťotlačové uhlíkové elektródy¹⁷, prípadne i uhlíkové pastové elektródy¹⁸. Elektrochemická depozícia kovového filmu medi¹⁹, elektropolymerizácia farbiva alizarínová červen S²⁰ (**Obr. 1.2 A**) či heterocyklickej zlúčeniny 3-amino-5-merkaptotriazolu²¹ (**Obr. 1.2 B**) na povrch GC elektród, prípadne i adsorpcia lipidu fosfatidyletanolamínu²² (**Obr. 1.2 C**) na uhlíkovú pastovú elektródu, sú použité modifikácie elektródových povrchov slúžiace k zvýšeniu selektivity a citlivosti stanovenia študovaných metabolitov. Za rovnakým účelom boli pripravené aj senzory založené na elektróde zo skleného uhlíku pokryté vrstvou molekulárne vtlačeného polyméru^{15, 23}.



Obr. 1.2 Chemická štruktúra (A) alizarínovej červeni S, (B) 3-amino-5-merkaptotriazolu a (C) fosfatidyletanolamínu.

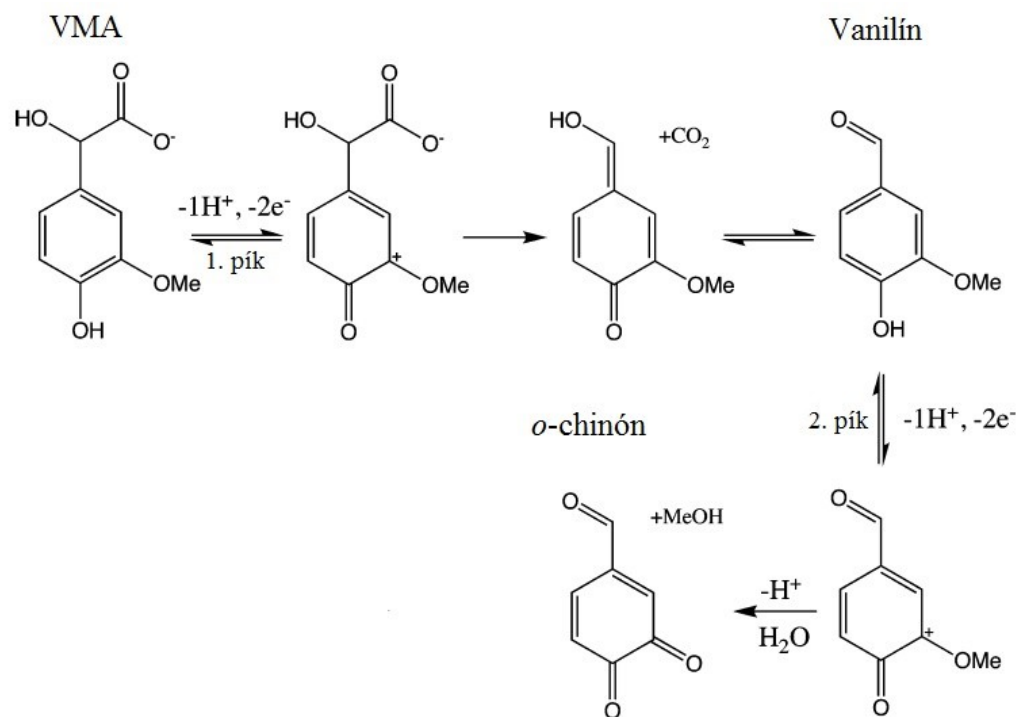
1.2.2 Mechanizmus elektrochemickej oxidácie HVA a VMA

O mechanizme oxidácie substituovaných *o*-metoxyfenolov, medzi ktoré sa radia i HVA a VMA, je známe, že v priebehu dvojelektrónového oxidačného procesu vzniká najprv fenoxylradikál a následne karbokatión na aromatickom kruhu, ktorý je napadaný molekulou vody vystupujúcou ako nukleofil. V dôsledku toho dochádza k strate metoxy skupiny za vzniku odpovedajúcich *o*-chinónov²⁴ (**Obr. 1.3**). Takýto reakčný mechanizmus elektrooxidácie pre študované látky bol preskúmaný a potvrdený na uhlíkových pastových elektródach modifikovaných surfaktantmi²⁵. Okrem toho, v priebehu reakcie môže dochádzať k stabilizácii radikálu reakciou s „rodičovskou“ zlúčeninou za vzniku diméru či polyméru, ktoré sa môžu prirodzene adsorbovať a spôsobovať pasiváciu elektród.



Obr. 1.3 Oxidačný mechanizmus substituovaných metoxyfenolov. Schéma upravené podľa Blanco-Lopéz et al²⁵.

Priebeh oxidácie môže byť ale významne ovplyvnený štruktúrou uhlíkových reťazcov na aromatickom kruhu. VMA, ktorá na rozdiel od HVA obsahuje hydroxyl naviazaný na alfa uhlíku postranného reťazca, je oxidovaná v dvoch krokoch¹⁴. Je to umožnené rearomatizáciou molekuly skrz tautomerizáciu po prvom oxidačnom kroku. Dochádza tak ku dekarboxylácii za vzniku vanilínu, ktorý je takisto následne oxidovaný, čoho výsledkom je vznik ďalšieho oxidačného signálu (**Obr. 1.4**).



Obr. 1.4 Mechanizmus elektrochemickej oxidácie VMA vo vodnom roztoku na „edge-plane“ pyrolitickej grafitovej elektróde. Schéma upravené podľa Li et al¹⁴.

1.3 Elektródové materiály na báze uhlíku

Uhlíkové materiály používané v elektrochémii zdieľajú niektoré vlastnosti s kovmi, ich štruktúra a chémia sa však dramaticky líšia od všetkých kovových elektród. Dobré známe alotropické modifikácie uhlíku, pri čom každá z nich môže existovať v rôznych materiáloch s lišiacimi sa vlastnosťami, zahŕňajú: (1) grafit, a jeho elektrochemicky veľmi dôležitú variantu sklený uhlík, (2) diamant a (3) fullerény, spomedzi nich najbežnejšie používané ako elektródový materiál sú uhlíkové nanotrubičky²⁶.

Široké potenciálové okno, ktoré je zvyčajne väčšie v porovnaní s pevnými kovovými elektródami, relatívne nízka cena, bohatá povrchová chémia, nízke prúdy pozadia či chemická inertnosť patria medzi dôvody, pre ktoré sú elektródy na báze uhlíku v súčasnosti rozšírené používané v elektroanalytickej chémii²⁷.

V ďalších podkapitolách sú podrobnejšie popísané vybrané uhlíkové materiály, a to na báze bórom dopovaného diamantu, a nemodifikovaného a modifikovaného skleného uhlíku.

1.3.1 Bórom dopovaný diamant

Diamant je materiál s kompletne sp^3 hybridizovaným uhlíkom, ktorý oplýva množstvom vynikajúcich vlastností ako sú extrémna tvrdosť, neobyčajná chemická inertnosť a stabilita, vysoká tepelná vodivosť, optická priehľadnosť, či mimoriadna odolnosť voči korózii v kyslých a zásaditých prostrediach bez dôkazu štruktúrnej degradácie²⁸⁻³⁰. Ide o jeden z najlepších prírodných izolátorov, nízky elektrický odpor je však dosiahnutý dopovaním diamantu určitými prvkami, najčastejšie atómami bóru, i keď je možné použiť taktiež dusík, fosfor či síru. Takto dochádza k nahradeniu izolačného správania za polovodičové či kovové v závislosti na úrovni dopovania. Vedľa úrovni dopovania sa za jeden z najdôležitejších faktorov ovplyvnenia vodivých vlastností diamantu považuje spôsob ukončenia jeho povrchu. Bola pozorovaná povrchová vodivosť vodíkmi ukončeného nedopovaného diamantu, pri plnej konverzii na C-O väzby dochádza k odstráneniu tejto povrchovej vodivej vrstvy, čoho dôsledkom je pokles reaktivity jeho povrchu a diamant vykazuje izolačný charakter³¹.

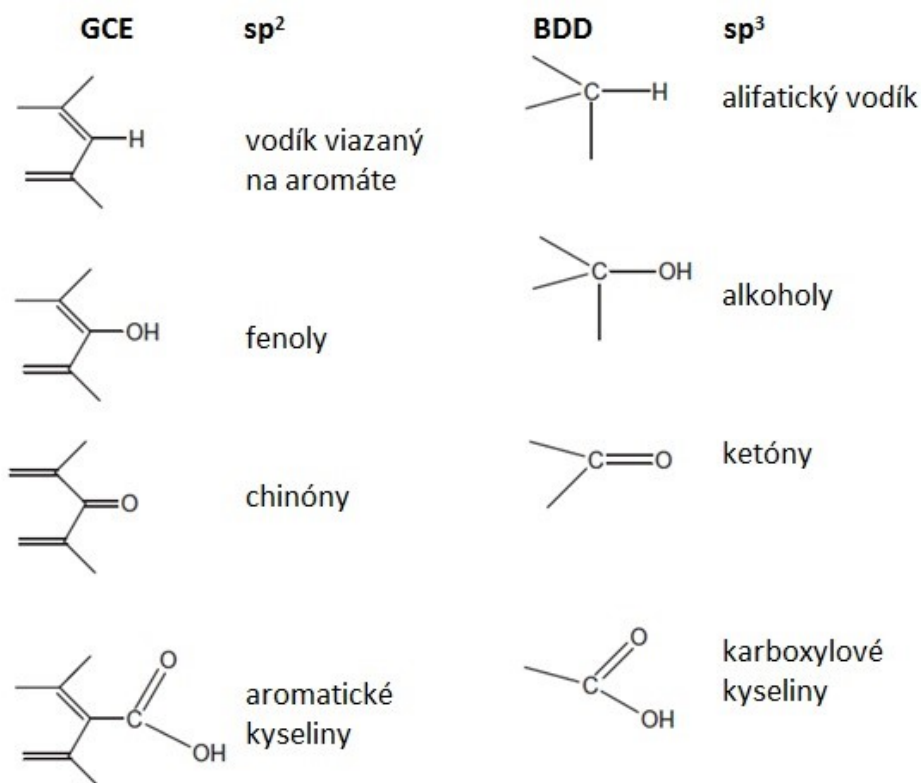
Oproti prevažnej väčšine všetkých ostatných uhlíkových materiálov, BDD je jediným z nich, ktorý v najčistejšej forme neobsahuje sp^2 uhlík. To vedie k extrémne zaujímavým a dôležitým vlastnostiam, ktoré zahŕňajú chemickú a mechanickú stabilitu, biokompatibilitu, extrémne široké potenciálové okno vo vodných i nevodných elektrolytoch, stabilitu voči korózii vo veľmi agresívnych prostrediach, inertný povrch s malými adsorpčnými schopnosťami a silnou tendenciou odolávať deaktivácii, veľmi nízku kapacitu elektródovej dvojvrstvy a nízky zvyškový prúd^{28, 32}, vysokokvalitné BDD filmy majú prúdovú hustotu prúdu pozadia približne 10-krát nižšiu než leštený sklený uhlík³³.

Elektrochemické a fyzikálnochemické vlastnosti diamantových elektród závisia i na spôsobe ukončenia ich povrchu^{30, 34}. Ukončenie BDD vodíkmi (H-BDD) vedie k nepolárnemu, hydrofóbnemu povrchu s vysokou vodivosťou a nízkym odporom prenosu náboja, a k negatívnej elektrónovej afinitite. Na druhej strane, kyslíkom ukončené povrchy (O-BDD) sú hydrofilné, polárne, s nízkou elektrickou vodivosťou a vyšším odporom, a majú pozitívnu elektrónovú afinitu. Potenciálové okno H-BDD elektród je užšie v porovnaní s O-BDD elektródami, k vývoju vodíku i kyslíku na oxidovanom povrchu dochádza pri vyšších hodnotách potenciálov^{32, 35}.

Čerstvo pripravená BDD elektróda obsahuje hydrogenované alifatické štruktúrne skupiny (sp^3 -hybridizovaný uhlík), a i napriek vysokej stabilite diamantu, konverzia z H-BDD na O-BDD môže byť prevedená niekoľkými spôsobmi^{30, 32, 36}. Najpopulárnejší a v praxi najbežnejší spôsob predstavuje elektrochemická anodická oxidácia^{34, 37, 38}, ktorá vedie k formovaniu najväčšieho množstva kyslík obsahujúcich funkčných skupín, ako sú napríklad alkoholová, ketónová a karboxylová skupina (**Obr. 1.5**), na uhlíkovom skelete³⁹, cez reakcie s hydroxylovým radikálom, ktorý vzniká pri rozklade vody (rovnica 1). Najzjavnejší viditeľný výsledok anodickej polarizácie je spravidla zlepšenie reprodukovateľnosti odozvy elektródy³⁸.



Oproti tomu je známe, že elektródy zo skleného uhlíku (GCE) obsahujú len sp^2 -hybridizované uhlíkové atómy^{27, 40}, ktoré sú súčasťou šesťčlenných aromatických kruhov, na ktorých sú prítomné funkčné skupiny ako benzochinón a hydrochinón, fenolické či karboxylové kyseliny (**Obr. 1.5**).



Obr. 1.5 Funkčné skupiny prítomné na GC a oxidovanom BDD elektródovom povrchu. Obrázok upravený podľa Narmadha et al³⁹.

Pripravené dopované diamantové elektródy zvyčajne obsahujú i malé množstvo sp^2 uhlíkových nečistôt, ktoré sú viac reaktívne než diamant, a táto zvýšená reaktivita spôsobuje vyššie prúdy pozadia^{33, 38}. Počas anodickej polarizácie v kyslom prostredí sp^2 uhlík silne koroduje, čím sú tieto nečistoty odstránené, produkujúc CO a CO₂ (cit³⁴). Bolo dokázané, že odstránenie amorfného sp^2 uhlíku vedie k zvýšeniu pracovného potenciálového okna. Anodická polarizácia vplyva i na čistotu elektródového povrchu a nachádza veľmi časté použitie v elektroanalýze organických látok^{39, 41-47}.

Iné štúdie odhalili⁴⁸⁻⁵¹, že je možný i reverzný proces aplikovaním dostatočne negatívnych potenciálov v kyslých prostrediach, kedy dochádza k rehydrogenácii povrchu BDD elektród, k opätovnému naviazaniu vodíku skrz produkciu vodíkových radikálov. Takýto spôsob elektrochemickej aktivácie, v podobe katodickej polarizácie elektródy, umožňuje dosiahnuť nízke limity detekcie a kvantifikácie, a taktiež zaistiť vysokú citlivosť, spoľahlivosť a reprodukovateľnosť⁵¹, a bol úspešne použitý pre stanovenie mnohých analytov⁵²⁻⁵⁵.

Anodická a katodická predpríprava BDD elektród je teda efektívnym spôsobom čistenia a aktivácie ich povrchov pre detekciu rôznych analytov, ide o jednoduché postupy regenerácie i v prípade adsorpcie. Na niektorých iných elektródach, medzi ktoré patrí i GC elektróda, sú organické látky omnoho ľahšie adsorbované, a zvyčajne potrebujú omnoho komplexnejší postup pre ich reaktiváciu po meraní, ako je leštenie či ultrazvukové čistenie⁴³.

Mechanické leštenie BDD elektród na časticách alumíny je pomerne nový, avšak taktiež účinný spôsob zaistenia dobre definovaných, stabilných a reprodukovateľných povrchov³⁶, ktorý je využívaný v elektroanalýze rozmanitých látok⁵⁶⁻⁶⁰ len posledných niekoľko rokov.

K elektrochemickému štúdiu elektródového povrchu sú často využívané redoxné markery, medzi tie najbežnejšie patria $[Ru(NH_3)_6]^{3+/2+}$, $[IrCl_6]^{2-/3-}$, $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$, $Fe^{3+/2+}$, benzochinón, kyselina askorbová či dopamín^{32, 33}. Rýchlosť prenosu elektrónu redoxného páru $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ je ovplyvnená fyzikálnochemickými vlastnosťami BDD²⁹, tento pár je veľmi senzitívny k ukončeniu povrchu elektródy, keďže interaguje s π elektrónmi, ktoré sú v prípade O-BDD prítomné napríklad v kyslík obsahujúcich funkčných skupinách. Citlivosť k prítomnosti nediamantových uhlíkových nečistôt je však obmedzená³³. Najrýchlejšia kinetika prenosu elektrónu tohto redoxného markeru je

pozorovaná na hydrogenovanom povrchu, spomaľuje sa so zvyšujúcim oxidačným pokrytím a mení sa na kvázi-reverzibilné po anodickej aktivácii^{49, 51}. Inhibičné efekty oxidovaného povrchu, spôsobené primárne v dôsledku odpudzovania medzi feroxyanidovými aniónmi a negatívnymi dipólmi kyslíkových funkčných skupín, môžu byť odstránené opätovnou rehydrogenáciou povrchu. Leštenie na alumine vedie k takmer reverzibilnej odozve $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ (cit^{36, 61}).

1.3.2 Sklený uhlík

Sklený uhlík sa vyznačuje vysokou hustotou a veľmi malou veľkosťou pórov, obsahuje stopové množstvá plynných a iných nečistôt, je možné jeho leštenie a vykazuje relatívne reprodukovateľné odozvy.

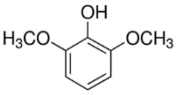
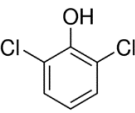
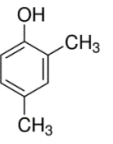
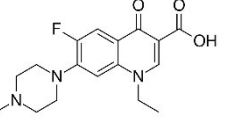
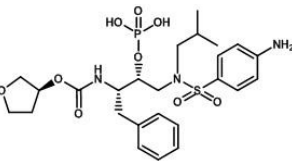
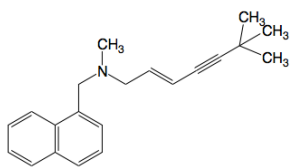
Elektródy zo skleného uhlíku sú najbežnejšie používané uhlíkové elektródy²⁶, vďaka ich výborným mechanickým a elektrickým vlastnostiam, širokému potenciálovému rozsahu, chemicky inertnej povahe, extrémne nízkej porozite, nepriepustnosti pre plyny a kompatibilitu so všetkými bežnými rozpúšťadlami^{27, 60}.

Takmer všetky GC elektródy sú zvyčajne leštené pomocou častíc aluminu²⁶ (o veľkosti približne $\sim 0,05 \mu\text{m}$) na hladkej leštiacej látke, pričom ich odozva závisí na leštiacom materiáli a použitom postupe. Ďalším spôsobom čistenia je termálna aktivácia, zahrievanie vo vákuu vedie ku GC povrchu s excelentným správaním, avšak tento postup je pomerne pomalý a nepraktický pri častom a opakovanom používaní elektród²⁷.

Výhodou GC oproti BDD elektróde je jej vyššia dostupnosť kvôli nižšej cene⁴⁰. Bolo prevedených niekoľko výskumov, s fenolickými látkami i liečivami, súčasne na oboch typoch elektród o rovnakej geometrickej ploche a za identických experimentálnych podmienok, rozdiely v správaní uvedených látok v závislosti na použitom elektródovom materiáli prehľadne zhrňuje tabuľka (**Tab. 1.1**). Vo všetkých uvedených štúdiách oxidácia skúmaných látok prebiehala pri nižších potenciáloch na GC elektróde, taktiež namerané prúdy píkov zvyčajne dosahovali väčšie hodnoty práve na tomto type uhlíkovej elektródy, čo pravdepodobne súvisí s vyššou hustotou elektroaktívnych miest na jej povrchu v porovnaní s BDD elektródou. Na elektródach na báze BDD boli dosiahnuté vyššie pomery prúdov oxidačných píkov analytov k prúdom

pozadia základných elektrolytov, v jednom z prípadov dokonca viac než 7-krát oproti GC elektróde⁶², i najnižšie hodnoty limitov detekcie príslušných zlúčenín.

Tab. 1.1 Vzájomné porovnanie GC a BDD elektród použitých pri elektrochemickom štúdiu uvedených zlúčenín.

Látka	Štruktúra	E_p (mV)		LOD ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)		Riadenie deja		Správanie		Cit.
		GC	BDD	GC	BDD	GC	BDD	GC	BDD	
2,6-DMoP		+570	+1060	-	-	-	-	KR	IR	63
2,6-DCP		+1150	+1290	-	-	-	-	KR	IR	39
2,4-DMF		+810	+1180	-	-	-	-	KR	IR	39
pefloxacín		+850	+1200	-	0,41	adsorpcia	difúzia	IR	IR	59
fosamprenavír		+1100	+1150	0,51	0,22	difúzia	difúzia	IR	IR	58
terbinafín		+805	+1083	0,25	0,24	difúzia	difúzia	IR	IR	55

Použité skratky: DMoP = dimetoxifenol, DCP = dichlórfenol, DMF = dimetylifenol, KR = kvázi-reverzibilné, IR = ireverzibilné.

1.3.2.1 Modifikácia mnohostenovými uhlíkovými nanotrubičkami

Uhlíkové nanotrubičky, reprezentujúce dôležitú skupinu nanomateriálov, pozostávajú z valcových grafénových vrstiev so sp^2 -hybridizovaným uhlíkom a s nanometrovým priemerom. Od svojho objavu v roku 1991 (cit⁶⁴), pritiahli na seba veľkú pozornosť kvôli ich unikátnym geometrickým, mechanickým, chemickým a elektrickým vlastnostiam^{65, 66}. Tieto vlastnosti ako malé rozmery, rozsiahly prístupný povrch, nízky elektrický odpor, elektrická a termálna vodivosť porovnateľná s meďou, pozoruhodne veľká mechanická sila a tvrdosť, a dobrá chemická stabilita dodávajú uhlíkovým nanotrubičkám nesmierny potenciál a robia z nich ideálny elektródový materiál^{66, 67}. Môžu sa správať elektricky ako kov alebo ako polovodič v závislosti na ich atómovej štruktúre⁶⁵. Obvykle sa rozdeľujú do dvoch skupín na základe počtu prítomných trubičiek, na jednostenové, ktoré sú pripravené z jedinej zrolovanej vrstvy grafénu, a mnohostenové uhlíkové nanotrubičky (MWCNTs) obsahujúce zrolovaných grafénových vrstiev niekoľko^{26, 66}.

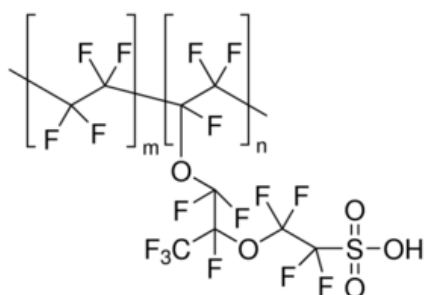
Modifikácia elektród MWCNTs môže viesť k zvýšeniu citlivosti, nižším limitom detekcie, rýchlejšej odozve, ktorá je dosahovaná vďaka ich veľkému povrchu a rýchlej elektródovej kinetike, a taktiež k väčšej odolnosti voči znečisťovaniu elektródového povrchu^{67, 68}.

Vzhľadom k hydrofóbnej povahe MWCNTs je pred ich použitím často vyžadovaná funkcionalizácia, a to z dôvodu zaistenia homogénnej disperzie^{67, 69}. Taktiež čerstvo nasyntetizované nanotrubičky obsahujú nečistoty, a procedúra použitá k ich funkcionalizácii odstraňuje toto znečistenie. Obvykle tento proces zavedenia funkčných skupín prebieha za použitia koncentrovanej kyseliny dusičnej alebo v jej zmesi s koncentrovanou kyselinou sírovou. Takto spracované MWCNTs sú zvyčajne dispergované vo vode, dimetylformamide, chitozane alebo v etanole pomocou sonikácie v ultrazvukovej čističke.

GC elektródy modifikované MWCNTs boli už úspešne aplikované k štúdiu a stanoveniu mnohých organických molekúl^{65, 67, 68, 70-74}.

1.3.2.2 Modifikácia Nafionom

Nafion⁷⁵ (**Obr. 1.6**) je polyaniónový perfluorovaný ionomér, derivát teflonu, pozostávajúci z hydrofóbneho fluorouhlíkového reťazca, ktorý je chemicky a teplotne veľmi stabilný, a hydrofilných sulfónových skupín, ktoré slúžia ako meniče kationov^{76, 77}. Môže byť použitý k modifikácii elektród, poskytujúc tak neobyčajnú chemickú inertnosť a stabilitu, veľmi dobrú vodivosť, biokompatibilitu a excelentnú schopnosť sformovať polymérny film na elektródovom povrchu, čím sa aj znižuje náchylnosť elektród k znečisteniu či pasivácii^{78, 79}.



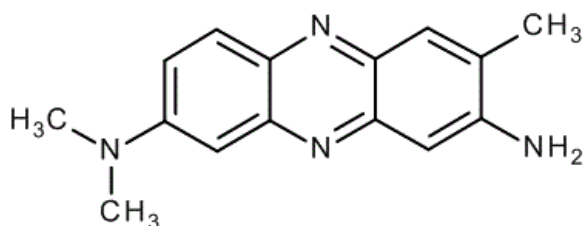
Obr. 1.6 Chemická štruktúra Nafionu.

Modifikácia GC elektród Nafionom⁸⁰ je dosiahnutá aplikovaním niekoľkých mikrolitrov jeho alkoholového roztoku na vyleštený povrch elektródy a následným sušením, a ide teda o vcelku jednoduchý spôsob modifikácie s potenciálom zvýšiť odozvu elektródy^{78, 81-84}.

1.3.2.3 Modifikácia polymérom neutrálnej červene

Fenazínové deriváty predstavujú jednu z najzaujímavejších skupín monomérov poskytujúcich vodivé elektroaktívne polyméry. Jednou z ich najatraktívnejších vlastností je ich vysoká katalytická aktivita^{85, 86}.

Medzi najviac používané fenazíny v elektrochemických aplikáciách patrí vo vode rozpustná neutrálna červen (N⁸,N⁸,3-trimetylfenazín-2,8-diamín)⁸⁷ (**Obr. 1.7**). Jej kryštálky sú červené, väčšina fenazínov má však odlišnú farbu v redukovanej a oxidovanej forme, a môžu byť teda použité aj ako redoxné indikátory. Niektoré z nich sú i pH senzitívne, takže je ich možné využiť i ako acidobázické indikátory, neutrálna červen mení farbu z červenej na žltú v rozsahu pH 6,8 – 8,0.



Obr. 1.7 Chemická štruktúra fenazínového farbiva neutrálna červeň.

Neutrálna červeň (NR) obsahuje vo svojej štruktúre primárnu aminoskupinu viazanú na heteroaromatický fenazínový kruh, ktorá je schopná počas oxidácie uvoľniť protón. Vznikajúci kationradikál je zodpovedný za elektrochemickú polymerizáciu monomérov, formujúc odpovedajúci vodivý polymérny film poly(neutrálna červeň) (PNR). Elektropolymerizačný proces je kontrolovaný nielen aplikovaným potenciálovým rozsahom, ktorý je zodpovedný za formovanie radikálov, pričom platí, že čím viac radikálov, tým vetvenejší polymér vzniká, ale tiež pH^{85, 87}. Dusičnanové anióny sú taktiež veľmi dôležité pre vznik PNR, keďže NO₃⁻ katalyzujú elektropolymerizáciu neutrálnej červene a stabilizujú vznikajúci polymér⁸⁵.

Spektroskopické štúdie potvrdili, že počas elektropolymerizácie nedochádza k zmene heteroaromatického systému monoméru, PNR filmy si zachovávajú štruktúru fenazínového kruhu, ktorý má byť práve zodpovedný za elektrochemické vlastnosti týchto polymérov. Monomér, aj od neho odvodený polymér, oplývajú rovnakým redoxným potenciálom a podobným optickým spektrom⁸⁸. PNR je ale na rozdiel od monoméru neutrálnej červene rozpustný, i to len čiastočne, iba v niektorých organických rozpúšťadlách⁸⁵.

Atraktivita PNR nespočíva len v jeho jednoduchšej príprave a nízkej cene, ale taktiež v jeho schopnosti výrazne zlepšiť stabilitu takto modifikovanej elektródy, či zvýšiť senzitivitu a detekčný limit niektorých látok^{86, 87, 89}.

1.3.3 Elektroanalýza fenolických látok

Nasledujúca tabuľka (**Tab. 1.2**) zhrňuje prehľad látok, ktorých súčasťou štruktúry je i fenol, obdobne ako je tomu aj v prípade HVA a VMA, a ktoré boli elektrochemicky

študované a stanovované voltametricky na uvedených elektródach na báze bórom dopovaného diamantu, a nemodifikovaného i modifikovaného skleného uhlíku.

Tab. 1.2 Prehľad elektrochemicky študovaných fenolických látok na rôznych elektródových povrchoch.

Elektróda	Elektroaktívne analyty s obsahom fenolickej skupiny
BDD elektróda	2,6-dichlórfenol ³⁹ , 4-chlór-3-metylfenol ⁴¹ , 2,6-dimetoxyfenol ^{39, 63} , 2,6-dimetylfenol ³⁹ , 2-nitrofenol ⁹⁰ , 2,4-dinitrofenol ⁹⁰ , bisfenol A ⁵⁴ , butylovaný hydroxylanisol ⁵³ , butylovaný hydroxytoluén ⁵³ , dopamín, estron ⁵² , fenol ^{43, 47} , hydrochinón ⁴³ , kapsaicín ⁵⁶ , kyselina chlorogenová ⁴² , naft-2-ol ⁴⁶ , <i>p</i> -nitrofenol ^{40, 43, 90} , pyrogallol ⁴⁴ , rutín ⁵⁷ , vanilín ⁴⁵
nemodifikovaná GCE	4-etylfenol ⁹¹ , 2-chlórfenol ⁹² , 2,4-dichlórfenol ⁹² , 2,6-dichlórfenol ³⁹ , 2,4,6-trichlórfenol ⁹² , 2,6-dimetoxyfenol ^{39, 63} , 2,6-dimetylfenol ³⁹ , dopamín ^{91, 93} , eriodiktyol ⁹⁴ , fenol ⁹¹ , hydrochinón ^{91, 95} , katechin ⁷⁴ , katechol ^{91, 95} , kliočinol ⁹⁶ , kvercetín ^{74, 97} , dihydrokvercetín ⁷⁴ , kyselina gallová ⁷⁴ , kyselina kávová ⁹⁸ , kyselina <i>p</i> -kumarová ⁹⁹ , kyselina usnová ¹⁰⁰ , mitoxantron ¹⁰¹ , morin ¹⁰² , <i>p</i> -nitrofenol ^{40, 103} , ochratoxin A ¹⁰⁴ , orientin ⁹⁴ , resorcinol ⁹¹ , resveratrol ¹⁰⁵ , robinin ⁹⁴ , rutín ^{74, 106} , tanín ⁷⁴ , tyramín ⁹¹ , tyrozín ⁹¹
MWCNTs/GCE	4-chlórfenol ⁷³ , 2,4-dichlórfenol ⁷³ , 2,4-dinitrofenol ⁶⁸ , dopamín ⁷¹ , fenol ⁷³ , fenylefrín ⁷² , hydrochinón ^{65, 70, 71} , <i>tert</i> -butylhydrochinón ⁷¹ , katechín ⁷⁴ , katechol ^{65, 70, 71} , kyselina gallová ⁷⁴ , <i>p</i> -krezol ⁷³ , oleuropeín ⁶⁷ , kvercetín ⁷⁴ , dihydrokvercetín ⁷⁴ , resorcinol ⁷⁰ , rutín ⁷⁴ , tanín ⁷⁴
Nafion/GCE	1-aminonaftalén ⁸² , 2-aminonaftalén ⁸² , dopamín ⁸⁴ , 2-nitrofenol ⁸¹ , 4-nitrofenol ⁸¹ , estrón ⁸³ , estriol ⁸³ , estradiol ⁸³ , fenol ⁷⁸
PNR/GCE	dopamín ⁸⁹

2 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

2.1 Reagencie a príprava roztokov

Všetky chemikálie boli kvality p.a. a boli používané bez akéhokoľvek ďalšieho čistenia: kyselina vanilmandľová, kyselina homovanilová (obe Sigma-Aldrich, USA), chlorid draselný, trihydrát hexakynoželeznanu draselného, kyselina octová (99 %), kyselina mravčia (98 %) (všetko Lachema, ČR), hydroxid sodný, kyselina sírová, kyselina trihydrogénfosforečná (85 %), metanol (všetko Penta, ČR), amoniakálny roztok (25 %), kyselina boritá, dihydrát dihydrogénfosforečnanu sodného, dodekahydrát hydrogénfosforečnanu disodného (všetko Lach-Ner, ČR), dusičnan draselný, dihydrogénfosforečnan draselný (obe Riedel-de Haën, Nemecko), trihydrát hydrogénfosforečnanu draselného (Panreac, Španielsko), kyselina dusičná (65 %, Chem-Lab NV, Belgicko), etanol (Merck, Nemecko), *N,N*-dimetylformamid (DMF, Fluka, Švajčiarsko), mnohostenové uhlíkové nanotrubičky (NanoLab, USA, o čistote ~95 %, priemere 30 ± 10 nm a dĺžke 1 – 5 μm), Nafion (5 % v/v, Sigma-Aldrich, UK), monomér neutrálna červeň (65 % obsah farbiva, Aldrich, Nemecko), diamantový sprej (veľkosť častíc 3 μm a 1 μm , Kemet International, UK), oxid hlinitý (veľkosť častíc 0,3 μm , Elektrochemické detektory, ČR; veľkosť častíc 0,05 μm , BDH Chemicals, UK).

Zásobné roztoky VMA a HVA o koncentrácii $1,0 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ boli pripravené v deionizovanej vode a uchovávané v tmavom a v chladnom prostredí pri teplote $6 \pm 2^\circ\text{C}$. Roztoky týchto dvoch kyselín o nižších koncentráciách boli pripravované presným riedením zásobného roztoku deionizovanou vodou či pufrom.

Ďalšie používané roztoky boli pripravené presným odmeraním, prípadne odvážením, vypočítaného množstva danej chemikálie, a doplnením príslušného rozpúšťadla v odmernej banke po rysku: $1,0 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ KCl, $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaOH, 5 % (v/v) NH_4OH , $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ H_2SO_4 , $3,0 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ HNO_3 a $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ KNO_3 boli pripravené v deionizovanej vode, $1,0 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ v $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ KCl a v $1,0 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ KCl, 5 % (v/v) a 10 % (v/v) HCOOH bol prichystaný v metanole.

Príprava pufrov prebiehala nasledovne: Brittonov – Robinsonov (BR) pufoz miešaním jeho kyslej zložky, tvorenej tromi kyselinami, bórítou, fosforečnou a octovou, každá o koncentrácii $0,04 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, a zásaditej zložky v podobe $0,2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ hydroxidu

sodného, vo vhodnom pomere na dosiahnutie vyžadovaného pH; $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ fosfátové pufre o pH 3,0, 7,0 a 12,0 boli pripravované vždy obdobným spôsobom, a to presným odmeraním či odvážením príslušnej kyslej zložky, t.j. 85 % H_3PO_4 , $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 12\text{H}_2\text{O}$, jej nariedením, prípadne rozpustením v deionizovanej vode, a dotitrovaním koncentrovaným roztokom silnej bázy na danú pH hodnotu; $0,025 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ fosfátový pufoer o pH 5,5 odvážením vypočítaného množstva KH_2PO_4 a $\text{K}_2\text{HPO}_4\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ a ich rozpustením v $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ KNO_3 .

K príprave všetkých vodných roztokov bola používaná deionizovaná voda (Millipore Mili plus Q systém, USA), ktorej odpor nebol menší než $18,2 \text{ M}\Omega$. Experimentálne merania boli uskutočnené za laboratórnej teploty.

2.2 Prístrojové vybavenie

Voltametrické merania boli prevedené na prístrojoch Eco-Tribo Polarograf ovládaný programom PolarPro 5.1 (Eco-Trend Plus, ČR) a IviumStat riadený softwarom IviumSoft verzia 2.024 (Ivium Technologies, Holandsko).

Bolo využívané konvenčné trojelektrodové usporiadanie s referenčnou argentchloridovou elektrodou ($\text{Ag}|\text{AgCl}|3 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ KCl}$), pomocnou platinovou elektrodou (obe Elektrochemické detektory, ČR), a ako pracovné elektródy boli použité BDD elektróda o priemere 3 mm, ploche $7,1 \text{ mm}^2$ a s úrovňou dopovania bórom $\sim 0,1 \%$ (Windsor Scientific, UK), a GC elektróda s priemerom 1 mm a plochou $0,785 \text{ mm}^2$ (Bio-Logic Science Instruments, Francúzsko), nemodifikovaná alebo modifikovaná.

Na digitálnych pH-metroch s kombinovanou sklenenou elektrodou (Jenway, UK a Crison, Španielsko) boli prevádzané merania pH hodnôt.

2.3 Pracovné postupy

2.3.1 Postup voltametrických meraní

V prípade všetkých používaných elektród boli cyklické voltamogramy merané od nižších hodnôt potenciálu k vyšším, a späť. Využívané rýchlosti scanu sú vždy uvedené u jednotlivých meraní.

2.3.1.1 BDD elektróda

Na začiatku každého meracieho dňa bol povrch BDD elektródy leštený na alumine o veľkosti častíc $0,3\ \mu\text{m}$, a bol metódou cyklickej voltametrie (CV) premeriavaný roztok $1\ \text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ v $1\ \text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ KCl, pričom tento proces sa opakoval až do dosiahnutia rozdielu potenciálov anodického a katodického píku ΔE_p pod hodnotu $170\ \text{mV}$. Následne bol meraný základný elektrolyt do ustálenia voltametrickej krivky príslušnou metódou od hodnoty $0\ \text{V}$ po únik základného elektrolytu v anodickej oblasti. V rovnakom rozsahu potenciálov a za tých istých podmienok boli premeriavané roztoky VMA a HVA. Medzi jednotlivými scanmi bola BDD elektróda anodicky aktivovaná vkladáním vysokého kladného potenciálu $E_{\text{akt}} = +2,4\ \text{V}$ po dobu $t = 30$ sekúnd, pokiaľ nie je uvedené inak.

U techniky diferenčnej pulznej voltametrie (DPV) bola zvolená rýchlosť polarizácie povrchu $\nu = 20\ \text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$, výška pulzu $+50\ \text{mV}$ a šírka pulzu $80\ \text{ms}$.

2.3.1.2 GC elektróda

Pred každým experimentom bola nemodifikovaná GC elektróda leštená na postupne menších časticiach diamantového spreju ($3\ \mu\text{m}$ a $1\ \mu\text{m}$) a aluminy ($0,05\ \mu\text{m}$) až do dosiahnutia čistého povrchu, ktorý bol overený premeraním roztoku základného elektrolytu v celom používanom rozsahu potenciálového okna. V prípade potreby bolo využívané i potenciálové cyklovanie v prostredí $0,1\ \text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaOH v rozmedzí od $-1,0\ \text{V}$ do $+1,0\ \text{V}$ s použitím rýchlosti polarizácie $\nu = 200\ \text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

Všetky modifikované GC elektródy boli používané priamo, najprv bola zmeraná len základná línia základného elektrolytu a následne roztok príslušnej kyseliny v danom elektrolyte, čistiaci leštiaci krok bol vykonaný vždy pred prevedením modifikácie.

DP voltamogramy boli merané rýchlosť scanu $\nu = 4 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ v rozsahu potenciálov od 0 V do +1,9 V, a parametre vkladaneho pulzu nadobúdali hodnotu +50 mV pre výšku a 50 ms pre šírku pulzu.

2.3.2 Príprava modifikovaných GC elektród

2.3.2.1 Modifikácia mnohostenovými uhlíkovými nanotrubičkami

Ako prvá bola prevedená purifikácia a tzv. funkcionalizácia¹⁰⁷, pri ktorej 60 mg MWCNTs bolo miešaných v silne kyslom prostredí $3 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ HNO}_3$ o objeme 5 ml po dobu 24 hodín, z dôvodu spôsobiť ich čiastočnú deštrukciu a zaviesť na ich povrch karboxylové funkčné skupiny. Po uplynutí tejto doby bol tuhý produkt zadržaný na filtračnom papieri a niekoľkokrát premývaný deionizovanou vodou až do neutrálnej hodnoty $\text{pH} \sim 7$, a následne sušený pri teplote 80°C ďalších 24 hodín.

Množstvo 6 mg suchých sfunkcionalizovaných MWCNTs bolo dispergované v 600 μl *N,N*-DMF a sonikovaných po dobu 4 hodín v ultrazvukovom kúpeli pre zaistenie homogénnej disperzie.

Modifikovaná MWCNTs/GCE bola pripravená aplikovaním 5 μl 1 % (m/v) MWCNTs v *N,N*-DMF na čistý, vyleštený elektródový povrch, po vysušení (~1 h) bola nanosená druhá identická vrstva, ktorá sa nechala schnúť cez noc do ďalšieho dňa.

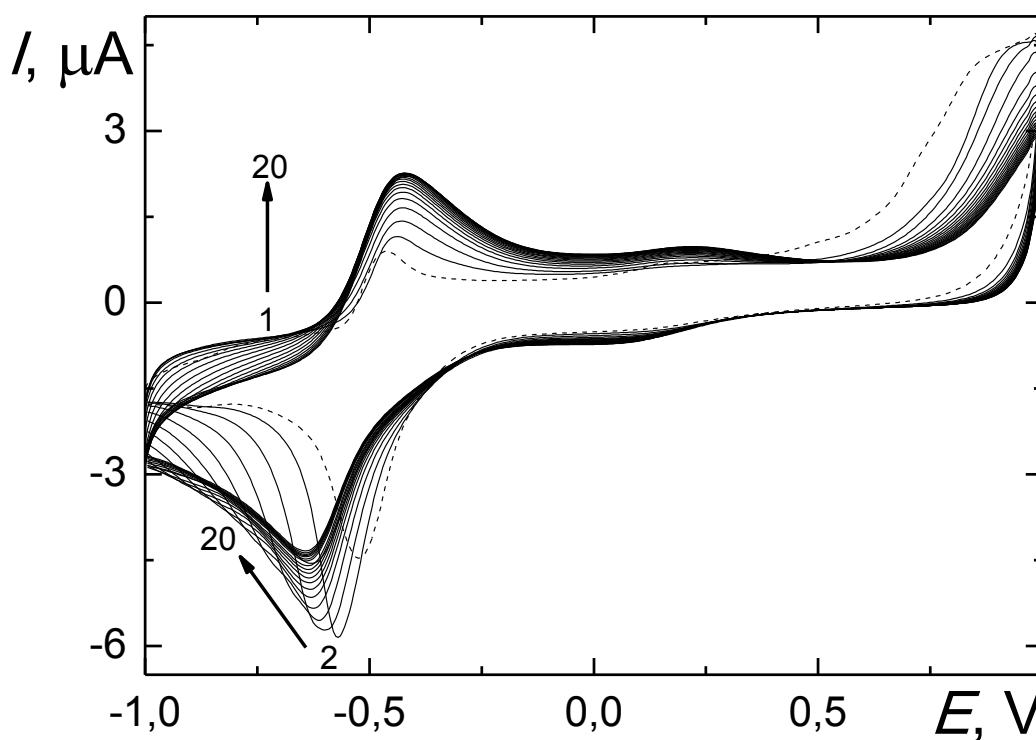
2.3.2.2 Modifikácia Nafionom

Jednoduchá príprava Nafion/GCE spočívala v aplikovaní jedinej vrstvy 1 % (v/v) roztoku Nafionu, vzniknutého nariadením 60 μl 5 % (v/v) tohto ionoméru v 240 μl etanolu, na čistý povrch GC elektródy, a sušením na vzduchu aspoň 2 hodiny.

2.3.2.3 Modifikácia polymérom neutrálnej červene

Vyleštená GC elektróda bola najprv ponechaná cyklovaniu v potenciálovom rozmedzí od $-1,0$ V do $+1,0$ V, pri rýchlosti scanu $\nu = 100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, v elektrolyte o rovnakom zložení, aký bol aj používaný k elektropolymerizácii, t.j. v $0,025 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ fosfátovom pufri o pH 5,5 + $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ KNO}_3$, až do dosiahnutia stabilného voltamogramu (zvyčajne 15 cyklov).

Elektrochemická polymerizácia neutrálnej červene⁶⁹ bola prevedená 20 cyklami v rozsahu potenciálov od $-1,0$ V do $+1,0$ V rýchlosťou scanu $\nu = 50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ v $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztoku monoméru NR pripraveného v $0,025 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ fosfátovom pufri o pH 5,5 + $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ KNO}_3$. Film PNR bol formovaný priamo na GC elektróde (**Obr. 2.1**).



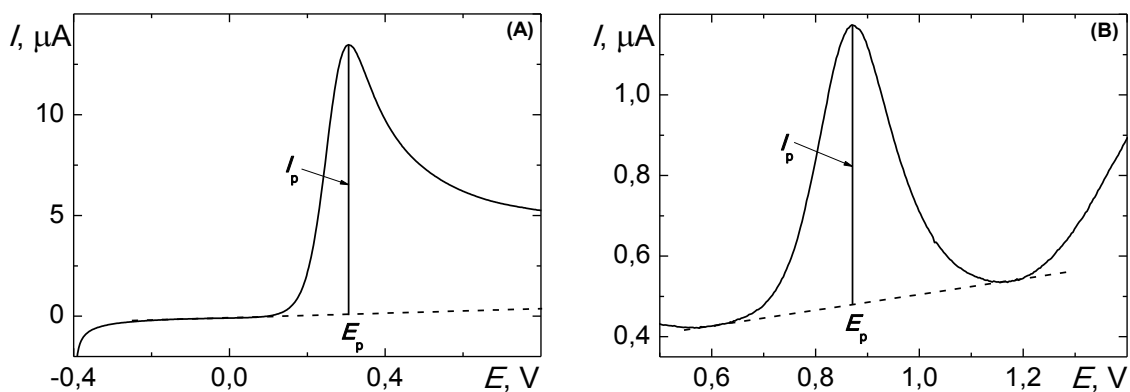
Obr. 2.1 Cyklické voltamogramy elektropolymerizácie neutrálnej červene na GC elektróde v $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NR v $0,025 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ fosfátovom pufri o pH 5,5 + $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ KNO}_3$. Použitá rýchlosť polarizácie $\nu = 50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Čiarkovane znázornený prvý scan.

2.3.3 Postup extrakcie na tuhej fáze

Pre extrakciu na tuhej fáze boli použité kolónky na báze zmiešaného módu, tvoreného kopolymérom polystyrénu a divinylbenzénu a silným aniónovým meničom, Chromabond HR-XA (60 mg, 3 ml, Macherey-Nagel, Nemecko) a nasledujúci modifikovaný postup¹⁰⁸. Kolónky boli aktivované pomocou 3 ml metanolu a 3 ml deionizovanej vody. Nasledovala aplikácia moču, prefiltrovaného skrz filtračný papier (MN GF – 3, Macherey-Nagel, Nemecko) a nariedeného 5 % (v/v) NH_4OH k zaisteniu ionizovanej podoby analytov, o objeme 15 ml. Po premývaní 2 x 2 ml 5 % (v/v) NH_4OH došlo k sušeniu kolónky za zvýšeného tlaku po dobu 1 min, elúcia analytov bola prevedená 2 x 1 ml 10 % (v/v) HCOOH v metanole a nasledovalo opäť 1 min sušenie kolónky. Zachytený eluát bol okyslený a doplnený do 5 ml $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ fosfátovým pufrom o pH 3,0.

2.3.4 Spôsoby vyhodnotenia voltametrických kriviek

Spracovanie nameraných voltametrických kriviek prebiehalo v príslušnom programe, buď v PolarPro 5.1 (Eco-Trend Plus, ČR) alebo IviumSoft verzia 2.024 (Ivium Technologies, Holandsko). Vyhodnocovanie píkov získaných technikou CV bolo prevedené pomocou predĺženia základnej línie, odčítanie potenciálov a výšok prúdov píkov nameraných DPV prebiehalo spájaním spojnic miním na oboch stranách daného píku (**Obr. 2.2**). V prípade DP voltamogramov nameraných na nemodifikovanej a modifikovanej GC elektróde, na prístroji IviumStat (Ivium Technologies, Holandsko), predchádzalo samotnému vyhodnoteniu odčítanie základnej línie v odpovedajúcom riadiacom softwari IviumSoft verzia 2.024 (Ivium Technologies, Holandsko).



Obr. 2.2 Spôsob vyhodnocovania voltametrických kriviek nameraných metódami (A) CV a (B) DPV.

2.3.5 Štatistické vyhodnotenie nameraných dát

Počet opakovaní každého experimentu bol vždy menší než sedem, určil sa preto medián \tilde{x} , a smerodajná odchýlka bolo vypočítaná z rozpätia R ($R = x_{\max} - x_{\min}$) a príslušného tabelovaného koeficientu k_n (n = počet meraní), interval spoľahlivosti $L_{1,2}$ sa získal vynásobením smerodajnej odchýlky s a tabelovaným koeficientom K_n^{109} . Neistoty všetkých meraní sú vyjadrené ako intervaly spoľahlivosti na hladine pravdepodobnosti $\alpha = 0,05$.

Hodnoty medze detekcie (LOD) boli vypočítané ako 3-násobok (rovnica 2) a hodnoty medze stanoviteľnosti (LOQ) ako 10-násobok (rovnica 3) smerodajnej odchýlky prúdov pík ($n = 10$) pre najnižšiu nameranú koncentráciu, vydelené smernicou príslušnej kalibračnej závislosti k .

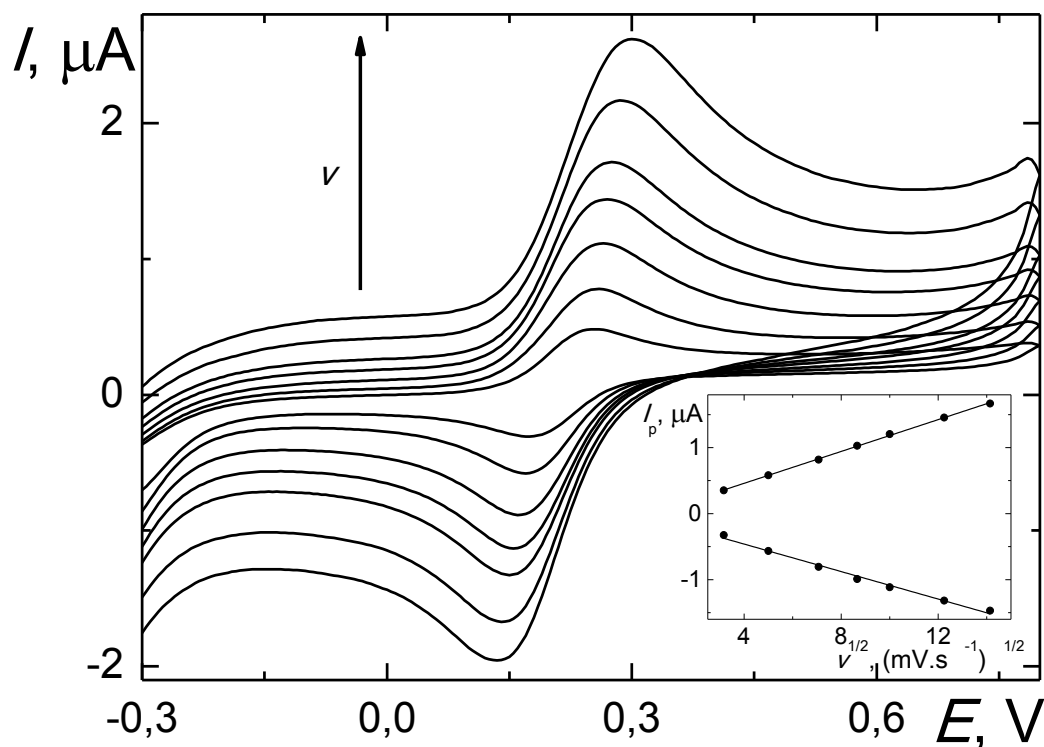
$$LOD = \frac{3 \cdot s_{10}}{k} \quad (2)$$

$$LOQ = \frac{10 \cdot s_{10}}{k} \quad (3)$$

3 VÝSLEDKY A DISKUSIA

3.1 Elektrochemická charakterizácia elektród

Elektrochemická charakterizácia GC elektródy bola prevedená pomocou redoxného páru $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ a metódy cyklickej voltametrie. Z nameraných cyklických voltamogramov daného redoxného markeru pri rôznej rýchlosti polarizácie elektródy v (**Obr. 3.1**) boli získané veľkosti zmien v rozdieloch potenciálov anodického a katodického píku ΔE_p a pomerov ich výšok I_A/I_K , uvedené v tabuľke (**Tab. 3.1**), a indikujúce kvázi-reverzibilný dej. Ani pre jednu z použitých rýchlostí scanu nenadobudli hodnôt vyžadovaných pre potvrdenie reverzibility elektrochemického deja, t.j. ΔE_p o hodnote 59 mV a pomer I_A/I_K rovný jednej.



Obr. 3.1 Cyklické voltamogramy $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ v $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ KCl namerané na nemodifikovanej GC elektróde pri rôznej rýchlosti polarizácie v ($\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$): 10, 25, 50, 75, 100, 150 a 200. Na vloženom grafe je znázornená závislosť prúdu pík I_p na druhej odmocnine rýchlosti polarizácie $v^{1/2}$.

Tab. 3.1 Zmeny v rozdiel potenciálov anodického a katodického píku ΔE_p a pomerov ich výšok I_A/I_K pre $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ v $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ KCl}$ v závislosti na rýchlosti polarizácie v . Merané na nemodifikovanej GC elektróde metódou CV.

$v \text{ (mV}\cdot\text{s}^{-1})$	$\Delta E_p \text{ (mV)}$	$ I_A/I_K $
10	80	1,09
25	90	1,03
50	105	1,02
75	115	1,04
100	125	1,08
150	145	1,11
200	165	1,13

Na základe tohto merania bola zostrojená závislosť prúdu anodického I_A i katodického píku I_K na druhej odmocnine rýchlosti polarizácie $v^{1/2}$ (**Obr. 3.1** vložený graf), ktorá je v prípade oboch pík lineárna, z čoho je možné usudzovať, že anodická oxidácia i katodická redukcia redoxného činidla $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ na GC elektróde sú deje riadené difúziou. Tieto lineárne závislosti sú charakterizované nižšie uvedenými rovnicami 4 a 5:

$$I_p \text{ (nA)} = (120,6 \pm 1,4) \cdot v^{1/2} \text{ (mV}\cdot\text{s}^{-1})^{1/2} - (22,4 \pm 12,8) \text{ (nA)} \quad (R = 0,9996) \quad (4)$$

pre anodickú oxidáciu a

$$I_p \text{ (nA)} = (-104,1 \pm 4,2) \cdot v^{1/2} \text{ (mV}\cdot\text{s}^{-1})^{1/2} - (44,7 \pm 38,9) \text{ (nA)} \quad (R = 0,9952) \quad (5)$$

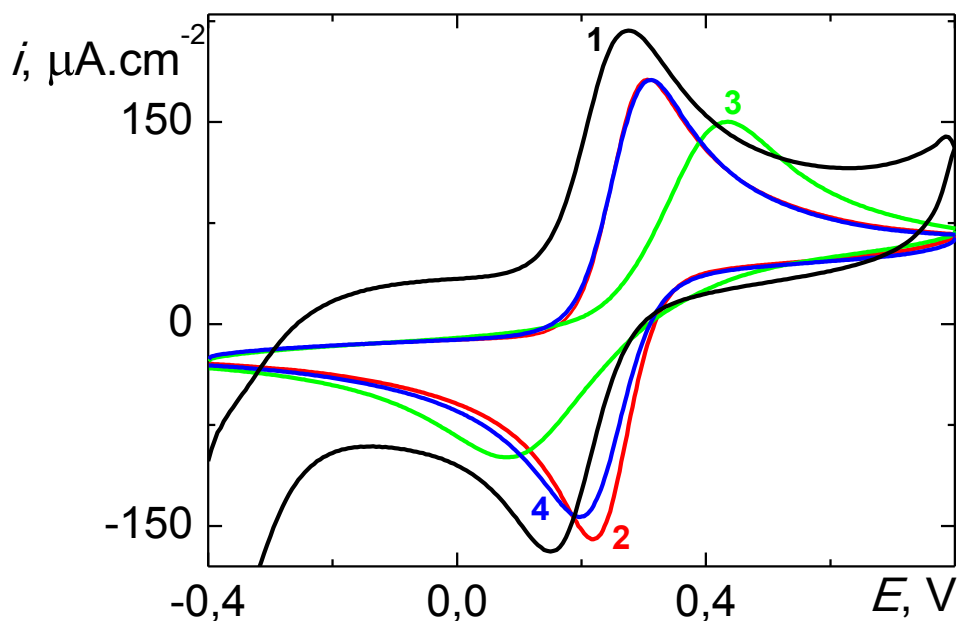
pre katodickú redukciu.

Obdobným spôsobom bola elektrochemicky charakterizovaná i BDD elektróda v rámci bakalárskej práce¹. K ich vzájomnému porovnaniu bola zvolená rýchlosť scanu $v = 100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, pri ktorej sú hodnoty rozdielu potenciálu anodického a katodického píku ΔE_p redoxného páru $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 125 mV pre GC elektródu a 86 mV pre novú, ešte žiadnym spôsobom neaktivovanú BDD elektródu, ktorej povrch je hydrogenovaný. Voltametrická odozva BDD elektródy sa však výrazne mení s úpravou jej povrchu,

najčastejšie využívaná je konverzia na oxidovaný povrch, čo je možné dosiahnuť anodickou polarizáciou v oblasti rozkladu vody. Anodická aktivácia BDD elektródy, v podobe vkladania vysokého kladného aktivačného potenciálu o hodnote $E_{akt} = +2,4$ V na jej povrch po dobu 20 min v silne kyslom prostredí $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$, mala dramatický efekt na redoxné správanie $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. Hodnota ΔE_p sa vplyvom tejto aktivácie výrazne zvýšila na 340 mV, čo je následkom odpudzovania medzi negatívnymi nábojmi kyslíkových funkčných skupín a použitého redoxného markeru, a taktiež jeho interakcie s π elektrónmi prítomnými práve na oxidovanom povrchu, ktoré spomaľujú kinetiku prenosu elektrónu redoxného páru $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. Ďalšou možnosťou aktivácie je leštenie povrchu elektródy na alumine, ktoré viedlo k opätovnému zníženiu hodnoty ΔE_p na 116 mV. Tieto rozdiely medzi rozličnými elektródovými povrchmi sú zhrnuté v tabuľke (**Tab. 3.2**) a graficky znázornené na obrázku (**Obr. 3.2**).

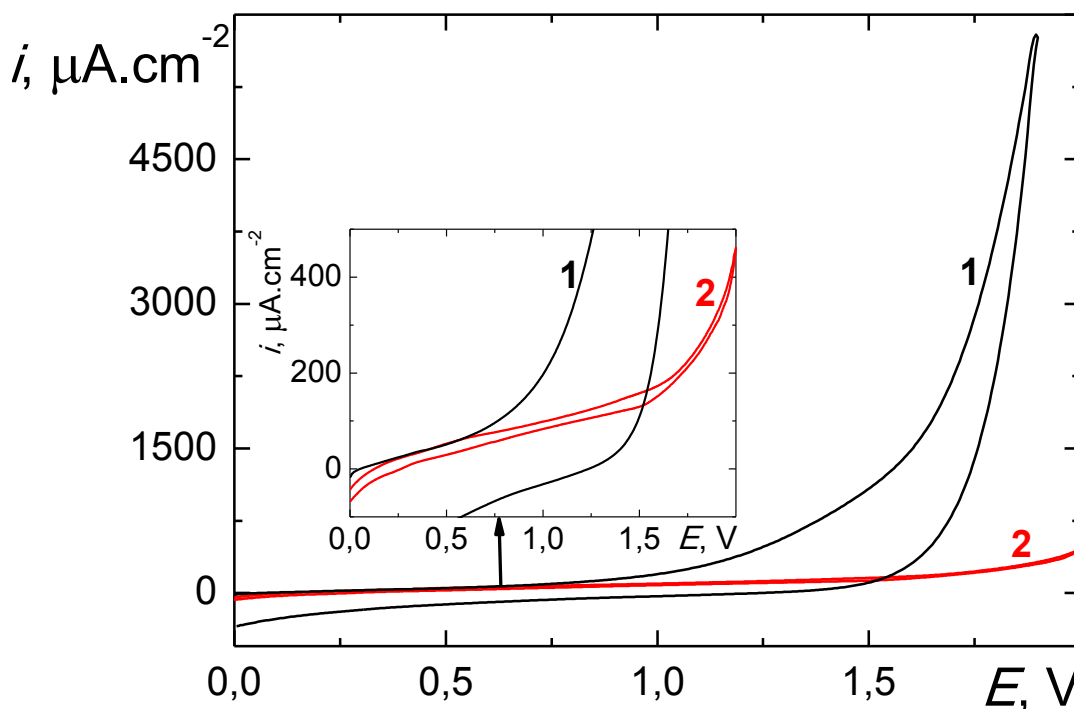
Tab. 3.2 Rozdiely potenciálov anodického a katodického píku ΔE_p pre $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ v $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ KCl}$ (GC) a v $1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ KCl}$ (BDD) na rôznych elektródových povrchoch pri rýchlosti ich polarizácie $\nu = 100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

Typ elektródového povrchu	ΔE_p (mV)
GC elektróda	125
hydrogenovaná BDD elektróda	86
anodicky aktivovaná BDD elektróda ($0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$, $E_{akt} = +2,4 \text{ V}$, 20 min)	340
mechanicky aktivovaná BDD elektróda (leštenie na alumine, 8 min)	116



Obr. 3.2 Cyklické voltamogramy $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ v $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ KCl}$ (GC) a v $1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ KCl}$ (BDD) namerané na (1) GC elektróde, (2) na novej, ešte žiadnym spôsobom neaktivovanej BDD elektróde, (3) po anodickej aktivácii BDD elektródy v $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$ pri vloženom potenciáli $E_{\text{akt}} = +2,4 \text{ V}$ pod dobu 20 min, (4) po mechanickej aktivácii BDD elektródy v podobe 8 min leštenia na alumine. Rýchlosť scanu $\nu = 100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

Na predchádzajúcom obrázku (**Obr. 3.2**) je možné pozorovať i výrazný rozdiel v prúdových hustotách i prúdu pozadia medzi GC a BDD elektródou, kde práve na prvej menovanej sú hodnoty prúdových hustôt podstatne väčšie. Túto významnú odlišnosť medzi uhlíkovými elektródami ukazuje a potvrdzuje i ďalší obrázok (**Obr. 3.3**), kde sú znázornené cyklické voltamogramy namerané v prostredí $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ fosfátového pufru o pH 3,0 rovnakou rýchlosťou scanu $\nu = 100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, a je zjavné, že na GC elektróde prúdové hustoty prúdu pozadia dosahujú viac než 10-násobne vyšších hodnôt v porovnaní s BDD elektródou.



Obr. 3.3 Cyklické voltamogramy $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ fosfátového pufru o pH 3,0 namerané na (1) GC elektróde a (2) BDD elektróde rýchlosťou scanu $\nu = 100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

3.2 Optimalizácia aktivácie elektród v prítomnosti HVA a VMA

Na obrázku (**Obr. 3.4**) je znázornených šesť kriviek HVA a VMA (každá o $c = 0,1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) nameraných priamo za sebou v prostredí BR pufru o pH 2,0 metódou DPV na GC elektróde.

V prípade $0,1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ HVA dochádza v dôsledku pasivácie elektródového povrchu k výraznému kontinuálnemu klesaniu výšok nameraných signálov, úbytok v odozve činil vyše 51,7 % na GC elektróde (v prostredí BR pufru o pH 2,0, **Obr. 3.4 A**), a 54,5 % na BDD elektróde¹ (v prostredí BR pufru o pH 3,0), v priebehu šiestich následných scanov bez použitia akéhokoľvek čistiacieho kroku medzi nimi. Hodnoty mediánov potenciálov E_p a prúdových hustôt pík i_p HVA, spoločne s intervalom spoľahlivosti a relatívnou smerodajnou odchýlkou sú zhrnuté v tabuľke (**Tab. 3.3**).

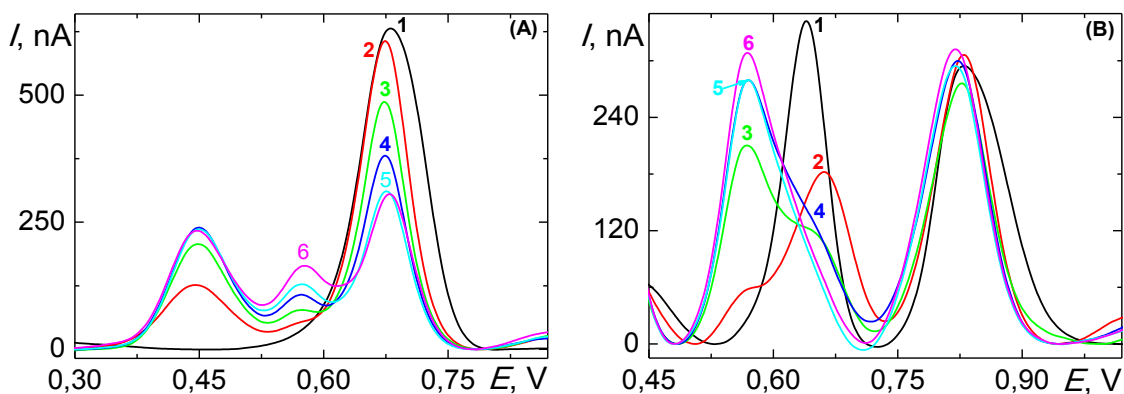
Tab. 3.3 Medián hodnôt potenciálu píku E_p a prúdovej hustoty píku i_p pre $0,1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ HVA v BR pufri o pH 2,0 (GC) a pH 3,0 (BDD) zmeranej šesťkrát za sebou metódou DPV, bez žiadneho spôsobu aktivácie medzi jednotlivým scanmi.

Elektroda	E_p (mV)	$s_r(E_p)$ (%)	i_p^a ($\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$)	$s_r^a(i_p)$ (%)
GC elektroda	675 ± 2	0,35	$55,3 \pm 16,6$	29,68
BDD elektroda ¹	895 ± 11	1,19	$6,6 \pm 2,5$	39,46

^a kontinuálny pokles prúdovej hustoty píku

Okrem kontinuálneho poklesu hodnôt prúdu píku I_p HVA môžeme v DP voltamogramoch za sebou nameraných kriviek na GC elektróde (**Obr. 3.4 A**) pozorovať pri 2. až 6. scane i vznik ďalších dvoch píkov, pri potenciáloch $E_p + 444 \text{ mV}$ a $+576 \text{ mV}$, ktoré vykazujú opačný trend oproti píku hlavnému, a to ten, že veľkosti prúdov týchto píkov s rastúcim počtom scanov rastú.

V prípade VMA, ktorá pri oxidácii na GC elektróde poskytuje dva píky, dochádza k výrazným zmenám predovšetkým u prvého oxidačného píku, kde je najprv zaznamenaný pokles jeho veľkosti, následne posun v potenciáli E_{p1} smerom k nižším hodnotám o 72 mV , a v priebehu 3. – 6. scanu je zaznamenaný nárast výšky prúdu tohto píku I_{p1} až k takmer pôvodnej hodnote získanej počas prvého scanu, i keď je pozorovaný zhoršený tvar píku (**Obr. 3.4 B**). Naopak, druhý oxidačný pík zostáva počas týchto šiestich následných scanov takmer nezmenený, čo je vidieť na uvedenom grafe (**Obr. 3.4 B**) a potvrdzujú to aj príslušné relatívne smerodajné odchýlky pre potenciál píku $s_r(E_{p2}) = 0,48 \%$ a prúd píku $s_r(I_{p2}) = 5,86 \%$.



Obr. 3.4 DP voltamogramy (A) $0,1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ HVA a (B) $0,1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ VMA v BR pufrí o pH 2,0. Označenie kriviek (1) – (6) v poradí, v akom boli namerané na nemodifikovanej GC elektróde, bez čistenia medzi jednotlivými scanmi.

Na základe týchto zistení boli skúmané rôzne spôsoby zamedzenia týchto nežiaducich javov a zaistenia čo najväčšej opakovateľnosti nameraných signálov. V prípade GC elektródy bola neúspešne vyskúšaná elektrochemická anodická aktivácia, a teda ako jediný vhodný spôsob čistenia jej povrchu sa preukázalo mechanické leštenie na postupne menších časticách diamantového spreju ($3 \mu\text{m}$ a $1 \mu\text{m}$) a aluminy ($0,05 \mu\text{m}$) v celkovej dĺžke trvania zhruba 5 minút.

BDD elektródu medzi následnými scanmi je možné čistiť taktiež mechanicky leštením na časticách aluminy ($0,3 \mu\text{m}$) alebo miešaním analyzovaného roztoku. Avšak jednou z jej výhod, oproti GC elektróde, je i možnosť využiť elektrochemickú aktiváciu *in-situ*, či už v katodickom režime pri záporných potenciáloch ($E_{\text{akt}} = -2,4 \text{ V}$, 120 s) iniciujúcich vývoj vodíku^{50, 51}, alebo v anodickom režime pri aplikovaní kladných potenciálov ($E_{\text{akt}} = +2,4 \text{ V}$, 60 s), kedy dochádza k rozkladu vody za vzniku hydroxylových radikálov^{37, 38}. Všetky tieto menované spôsoby aktivácie povrchu BDD elektródy v priebehu meraní za sebou idúcich scanov boli vyskúšané, ich grafické zobrazenie je na obrázku (**Obr. 3.5**) a porovnanie vplyvu aktivácie na veľkosti hodnôt potenciálu E_p a výšky prúdu píku I_p HVA je uvedené v tabuľke (**Tab. 3.4**).

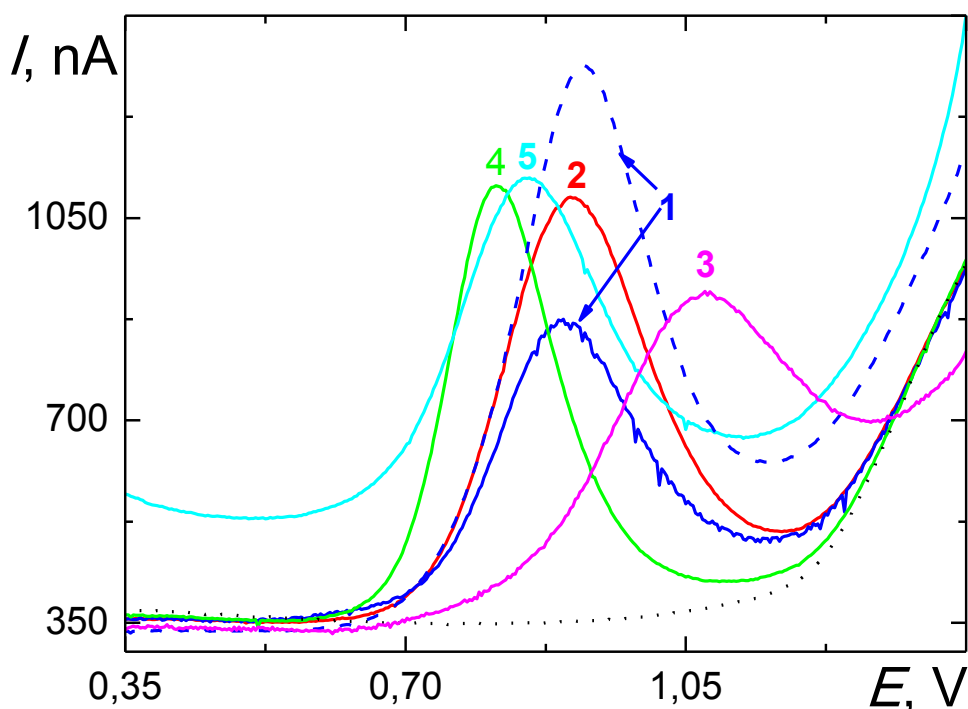
Najreprodukovateľnejšie a najväčšie výšky signálov boli dosiahnuté práve pri použití anodickej aktivácie za súčasného miešania roztoku. Na hydrogenovanej BDD elektróde po katodickej polarizácii je pozorovaný nárast prúdu pozadia základného elektrolytu, a tým menší prúd píku HVA o skoro 27,3 % a posun potenciálu píku o +35 mV k pozitívnejším hodnotám v porovnaní s oxidovaným BDD povrchom

po anodickej polarizácii. Výraznejší posun v potenciáli píku HVA k vyšším hodnotám, a to až o vyše 260 mV, i pokles voltametrickej odozvy tejto látky takmer o 50,9 %, je zaznamenaný na leštenom BDD povrchu, na ktorom významne prevládajú C-C väzby medzi sp^3 hybridizovanými uhlíkmi diamantu³⁶, oproti odozve získanej na anodicky aktivovanej BDD elektróde, kde naopak dominujú väzby uhlíku s kyslíkom v podobe funkčných skupín ako C-OH, C-O-C, C=O a COOH³⁶.

Tab. 3.4 Vplyv aktivácie medzi jednotlivými scanmi na potenciály pík E_p a prúdy pík I_p 0,1 mmol·l⁻¹ HVA v BR pufrí o pH 3,0 namerané na BDD elektróde metódou DPV. Uvedené mediány, intervaly spoľahlivosti a relatívne smerodajné odchýlky pre šesť následných scanov.

Podmienky aktivácie	E_p (mV)	$s_r(E_p)$ (%)	I_p (nA)	$s_r(I_p)$ (%)
Miešanie, 60 s (cit ¹)	908 ± 12	1,35	658,6 ± 47,1	7,05 ^a
Leštenie na alumine, 30 s	1077 ± 17	1,54	354,0 ± 13,7	3,81
Miešanie, $E_{akt} = +2,4$ V, 60 s (cit ¹)	816 ± 10	1,17	720,9 ± 24,4	3,34
Miešanie, $E_{akt} = -2,4$ V, 120 s (cit ¹)	851 ± 9	1,07	522,3 ± 15,3	2,89

^a kontinuálny pokles prúdu



Obr. 3.5 DP voltamogramy $0,1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ HVA namerané na BDD elektróde v BR pufrí o pH 3,0 pri rôznom spôsobe aktivácie medzi následnými scanmi: (1) bez aktivácie; čiarkovane prvý scan, plnou čiarou štvrtý scan, (2) miešanie, 60 s, (3) leštenie na alumine, 30 s, (4) miešanie, potenciál anodickej aktivácie $E_{\text{akt}} = +2,4 \text{ V}$, 60 s, (5) miešanie, potenciál katodickej aktivácie $E_{\text{akt}} = -2,4 \text{ V}$, 120 s. Plnými čiarami zobrazené štvrté scany. Bodkovane znázornený základný elektrolyt.

Z nasledujúcej tabuľky (**Tab. 3.5**), ktorá zhrňuje a zároveň porovnáva najoptimálnejšie spôsoby aktivácie oboch používaných elektród vyplýva, že opakovateľnosť nameraných signálov vyjadrená relatívnou smerodajnou odchýlkou s_r je približne 3,3-krát vyššia na anodicky aktivovanej BDD elektróde v porovnaní s leštenou GC elektródou.

Tab. 3.5 Medián hodnôt potenciálu E_p a veľkosti prúdovej hustoty píku i_p pre 0,1 mmol·l⁻¹ HVA v BR pufri o pH 3,0 zmeranej šesťkrát za sebou metódou DPV, s použitím najvhodnejšieho spôsobu aktivácie povrchu GC a BDD elektródy medzi jednotlivými scanmi.

Elektróda	Spôsob aktivácie	E_p (mV)	$s_r(E_p)$ (%)	i_p (μA·cm ⁻²)	$s_r(i_p)$ (%)
GC	leštenie	542 ± 4	0,73	126,9 ± 14,2	10,99
BDD ¹	anodická aktivácia	816 ± 10	1,17	10,2 ± 0,34	3,34

($E_{akt} = +2,4$ V, 60 s)

3.2.1 Vplyv pH prostredia a doby leštenia povrchu BDD elektródy na alumine na voltametrickú odozvu HVA a VMA

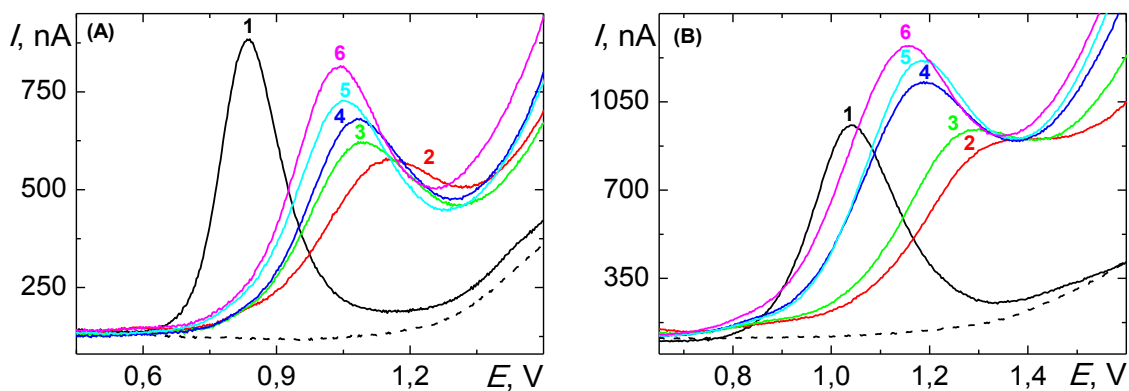
Mechanická aktivácia BDD elektródy v podobe leštenia na alumine je pomerne novou záležitosťou, a preto bol bližšie preskúmaný jej vplyv na voltametrickú odozvu HVA a VMA. Výsledky boli porovnané s anodicky aktivovanou BDD elektródou.

Z vyššie uvedenej tabuľky (**Tab. 3.4**) vyplýva, že obe spôsoby aktivácie, elektrochemická anodická aktivácia i leštenie na časticiach aluminy, poskytujú dobre reprodukovateľné signály, nedochádza ku kontinuálnemu poklesu prúdov píkov I_p , relatívne smerodajné odchýlky $s_r(I_p)$ sa v oboch prípadoch pohybujú v rozsahu 3 - 4 %. Boli ale pozorované markantné rozdiely nielen v znížení veľkosti prúdov píkov I_p , ale i v posune potenciálov oxidačných píkov E_p HVA a VMA smerom k výrazne pozitívnejším hodnotám pri použití mechanickej aktivácie, v porovnaní s anodickým spôsobom (**Obr. 3.6**). Čo je rozdielne správanie oproti iným fenolickým látkam, napr. *m*-krezolu, v prípade ktorého v kyslom prostredí dochádzalo pri použití leštenia k posune jeho voltametrickej odozvy k menej pozitívnym potenciálom¹¹⁰. Pri porovnaní štruktúry *m*-krezolu a HVA a VMA je možné predpokladať vyššiu hydrofobicitu prvej menovanej látky, ktorá interaguje s relatívne hydrofóbnym povrchom BDD elektródy po odstránení kyslíkatých funkčných skupín pri leštení, čo vedie k zníženiu potenciálu oxidácie.

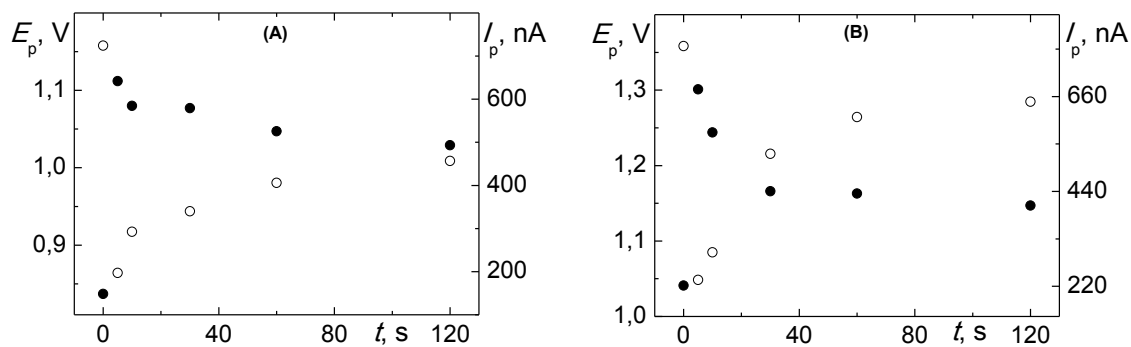
Následne bol študovaný vplyv doby leštenia t povrchu BDD elektródy na alumine, po predchádzajúcej aplikácii anodickej aktivácie, na potenciály E_p i prúdy pík I_p oboch skúmaných kyselín v prostredí $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ fosfátového pufru o pH 3,0 metódou DPV, pričom konkrétne skúmané časy t (s) boli: 5, 10, 30, 60 a 120 s. Trend u HVA i VMA je v podstate rovnaký, s predlžujúcou dobou leštenia dochádza k znižovaniu hodnôt potenciálov pík E_p , o 83 mV u HVA a o 154 mV v prípade VMA, a k nárastu veľkosti prúdov nameraných pík I_p , a to o 131,9 % u HVA a 176,1 % u VMA. Hodnôt získaných na BDD elektróde po anodickej polarizácii sa nepodarilo dosiahnuť ani pri najdlhšie trvajúcim, t.j. 120 s leštení povrchu elektródy na alumine. Výsledky tohto merania sú prehľadne uvedené v tabuľkovej (**Tab. 3.6**) i v grafickej podobe (**Obr. 3.6**). Nebola preukázaná lineárna závislosť potenciálov E_p a prúdov pík I_p HVA a VMA na dobe leštenia t (**Obr. 3.7**).

Tab. 3.6 Veľkosti potenciálov pík E_p a prúdov pík I_p HVA a VMA (každá o $c = 0,1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) v prostredí $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ fosfátového pufru o pH 3,0 namerané na BDD elektróde metódou DPV po elektrochemickej anodickej aktivácii ($E_{\text{akt}} = +2,4 \text{ V}$, 30 s), odpovedajúcej času $t = 0$, a následne po rôznej dobe leštenia BDD povrchu na alumine.

Doba leštenia t (s)	HVA		VMA	
	E_p (mV)	I_p (nA)	E_p (mV)	I_p (nA)
0	837	724,3	1041	776,9
5	1112	197,0	1301	234,7
10	1080	292,6	1244	298,7
30	1077	339,9	1166	527,4
60	1047	405,8	1163	612,5
120	1029	456,9	1147	648,0



Obr. 3.6 DP voltamogramy (A) $0,1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ HVA a (B) $0,1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ VMA v prostredí $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ fosfátového pufru o pH 3,0 namerané po (1) elektrochemickej anodickej aktivácii ($E_{\text{akt}} = +2,4 \text{ V}$, 30 s) a následnom leštení BDD povrchu na alumine po dobu: (2) 5 s, (3) 10 s, (4) 30 s, (5) 60 s, (6) 120 s. Čiarkovane je znázornený základný elektrolyt.



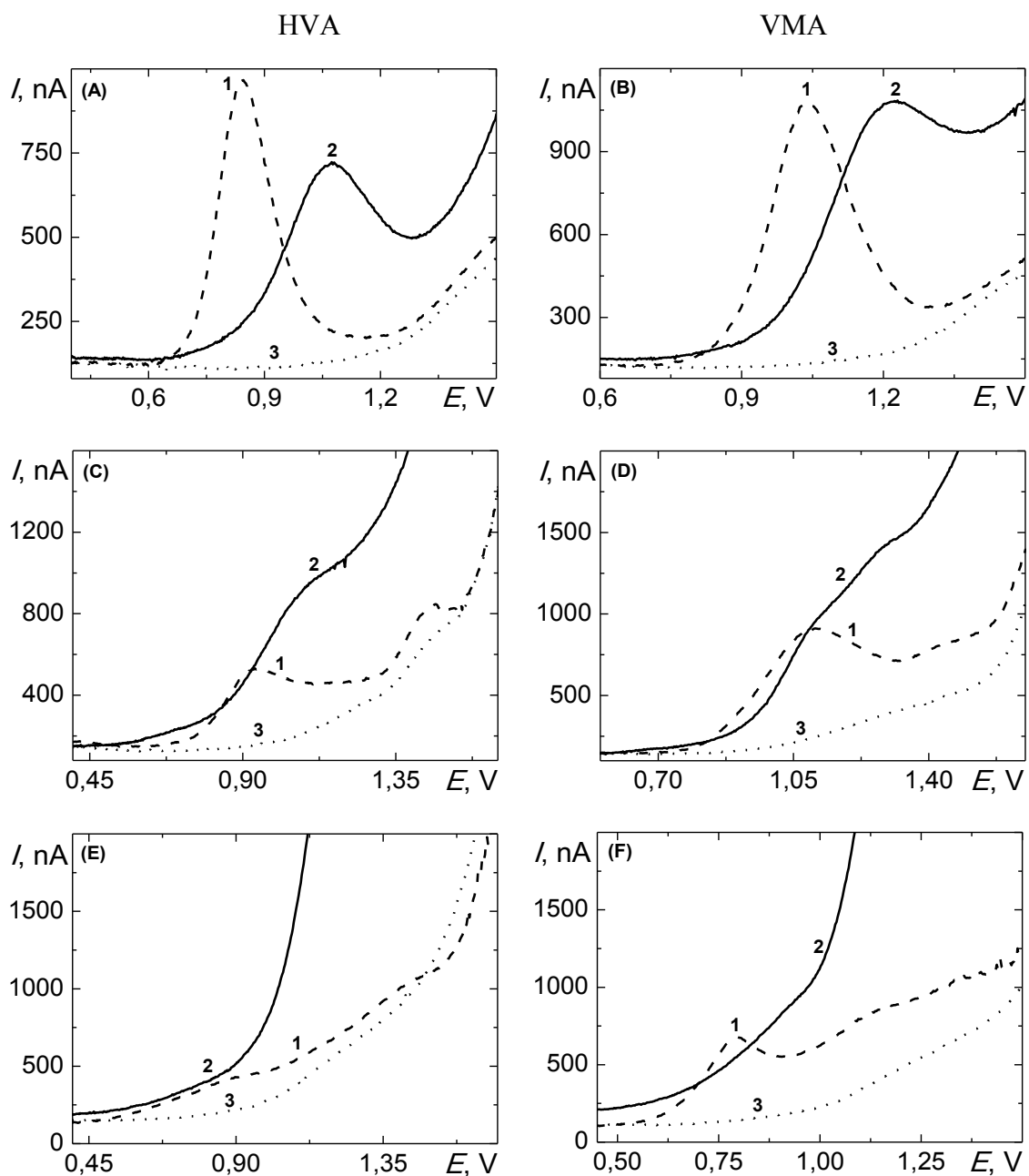
Obr. 3.7 Závislosť veľkosti (●) potenciálov pík E_p a (○) prúdov pík I_p (A) $0,1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ HVA a (B) $0,1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ VMA v prostredí $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ fosfátového pufru o pH 3,0 na dobe leštenia t povrchu BDD elektródy na alumine. Čas $t = 0 \text{ s}$ odpovedá elektrochemickej anodickej aktivácii ($E_{\text{akt}} = +2,4 \text{ V}$, 30 s). Namerané metódou DPV.

Následne bol preskúmaný i vplyv prostredia o rôznej hodnote pH na namerané signály HVA a VMA (každá o $c = 0,1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), na alumine vyleštenej BDD elektróde (doba leštenia $t = 30 \text{ s}$). Merania boli prevedené v $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ fosfátovom pufri o pH 3,0, pH 7,0, a pH 12,0 a boli porovnané s voltametrickými odozvami HVA a VMA získanými na BDD elektróde po anodickej polarizácii jej povrchu.

V prostredí o kyslej hodnote pH 3,0 sú namerané píky HVA a VMA po mechanickej aktivácii najlepšie vyvinuté (**Obr. 3.8 A, B**), v neutrálnom prostredí o pH 7,0 píky nadobúdajú na vyleštenej elektróde výrazne horší charakter, čo značne komplikuje ich

analytické vyhodnotenie (**Obr. 3.8 C, D**). Žiaden pík HVA a VMA nebol zaznamenaný v bázičkom prostredí o pH 12,0 po leštení povrchu BDD elektródy (**Obr. 3.8 E, F**). Opäť je tu nachádzaný výrazný rozdiel oproti iným fenolickým zlúčeninám, napr. už spomínanému *m*-krezolu, kde naopak najvyššie hodnoty výšky píku I_p tejto látky pri použití mechanickej aktivácie BDD elektródy v podobe leštenia na alumine boli zaznamenané v zásaditej oblasti pH 10,0 – 12,0 (cit¹¹⁰).

Z nameraných DP voltamogramov HVA (**Obr. 3.8 A, C, E**) i VMA (**Obr. 3.8 B, D, F**) vyplýva, že ani v jednom zo skúmaných prostredí o rozdielnom pH sa nedá mechanické leštenie BDD elektródy na časticiach aluminy považovať za výhodnejší spôsob aktivácie jej povrchu pre stanovenie študovaných klinických markerov.



Obr. 3.8 DP voltamogramy (A, C, E) $0,1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ HVA a (B, D, F) $0,1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ VMA v prostredí $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ fosfátového pufru o (A, B) pH 3,0, (C, D) pH 7,0, a (E, F) pH 12,0 namerané pri použití (1) elektrochemickej anodickej aktivácie $E_{\text{akt}} = +2,4 \text{ V}$, 30 s a (2) mechanickej aktivácie v podobe leštenia na alumine po dobu 30 s. (3) Základný elektrolyt je znázornený bodkovane.

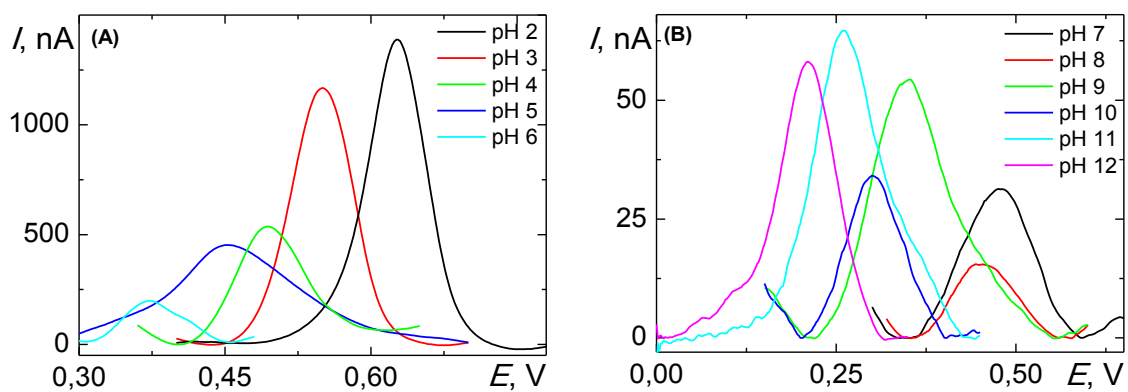
3.3 Vplyv pH na elektrochemické správanie HVA a VMA na GC elektróde

K prešetreniu vplyvu pH na voltametrickú odozvu skúmaných látok (každá o $c = 0,1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$) na GC elektróde bol použitý BR pufor v rozmedzí hodnôt pH 2,0 – 12,0 a metóda DPV.

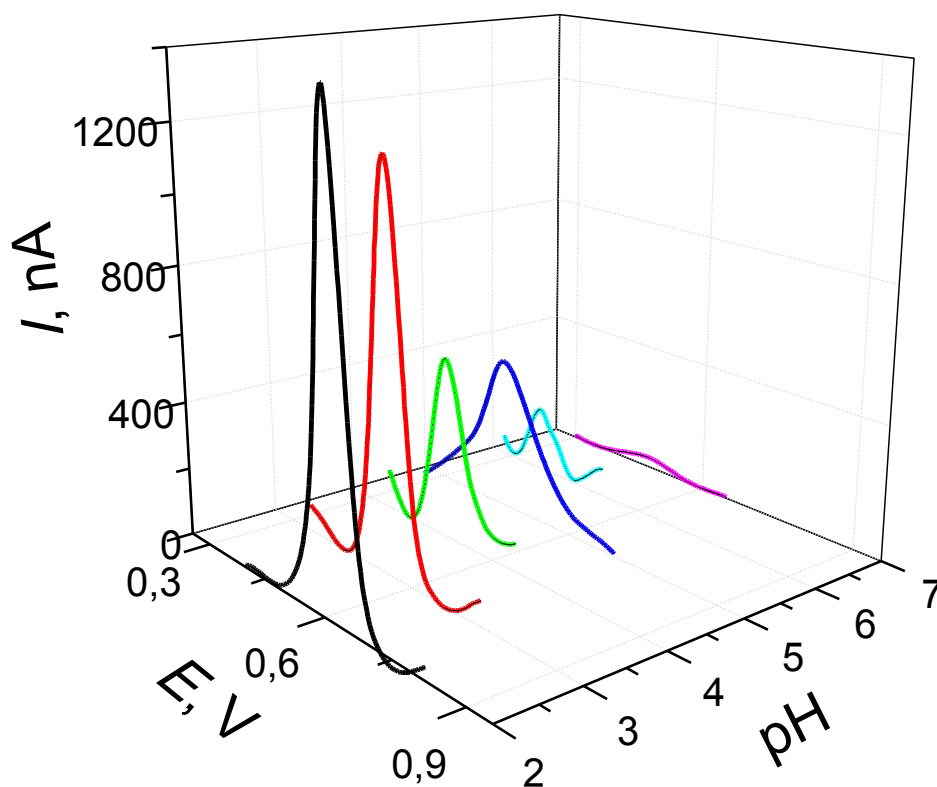
Hodnoty potenciálov E_p a prúdov píku I_p HVA v rôznom pH prostredí sú uvedené v tabuľke (**Tab. 3.7**) a grafické znázornenie príslušných DP voltamogramov je na obrázku (**Obr. 3.9**) i v podobe 3D grafu (**Obr. 3.10**). Z nich zreteľne vyplýva, že v celom študovanom rozsahu pH HVA poskytuje vždy len jeden pík, ktorý je najlepšie vyvinutý a dosahuje najväčšie výšky práve v kyslom prostredí o pH 2,0 a 3,0. Následne s rastom pH hodnôt prúd píku dramaticky klesá, a v neutrálnom a bázičkom prostredí sa veľkosť poskytovaného signálu pohybuje len na úrovni niekoľkých desiatok nA. Taktiež môžeme s nárastom pH prostredia pozorovať i znižovanie hodnoty potenciálu, pri ktorých sa pík HVA v DP voltamogramoch objavuje.

Tab. 3.7 Potenciály E_p a prúdy píkov I_p 0,1 mmol·l⁻¹ HVA v BR pufri v rozmedzí pH 2,0 – 12,0. Namerané metódou DPV na nemodifikovanej GC elektróde.

pH	E_p (mV)	I_p (nA)
2,0	626	1397,6
3,0	550	1170,6
4,0	494	506,3
5,0	454	358,4
6,0	372	187,3
7,0	476	31,4
8,0	444	15,5
9,0	352	54,5
10,0	300	34,2
11,0	262	64,7
12,0	210	58,2



Obr. 3.9 DP voltamogramy 0,1 mmol·l⁻¹ HVA v BR pufri v rozmedzí pH (A) 2,0 – 6,0 a (B) 7,0 – 12,0 namerané na nemodifikovanej GC elektróde.



Obr. 3.10 3D zobrazenie DP voltamogramov $0,1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ HVA v BR pufri v rozmedzí pH 2,0 – 7,0 nameraných na nemodifikovanej GC elektróde.

Boli spracované závislosti potenciálu píku E_p a prúdu píku I_p HVA na pH (**Obr. 3.11**), na ktorých je možné pozorovať linearitu závislosti E_p na pH vyskytujúcu sa v rozmedzí pH 2,0 – 6,0 a pH 7,0 – 12,0, a je ich možné popísať nasledujúcimi rovnicami 6 a 7:

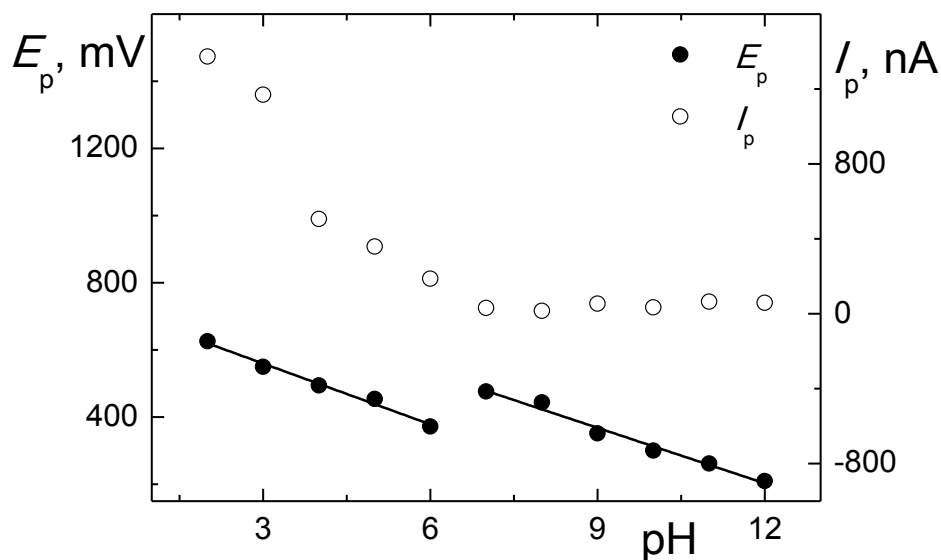
$$E_p (\text{mV}) = (-60 \pm 4) \cdot \text{pH} + (741 \pm 16) \quad (R = 0,992) \quad (6)$$

pre rozsah pH 2,0 – 6,0 a

$$E_p (\text{mV}) = (-55 \pm 4) \cdot \text{pH} + (864 \pm 35) \quad (R = 0,989) \quad (7)$$

pre rozsah pH 7,0 – 12,0.

Veľkosti hodnôt oboch smerníc sú blízko teoretickej hodnote 59 mV/pH , ktorá indikuje oxidačný mechanizmus zahŕňajúci rovnaký počet elektrónov i protónov.



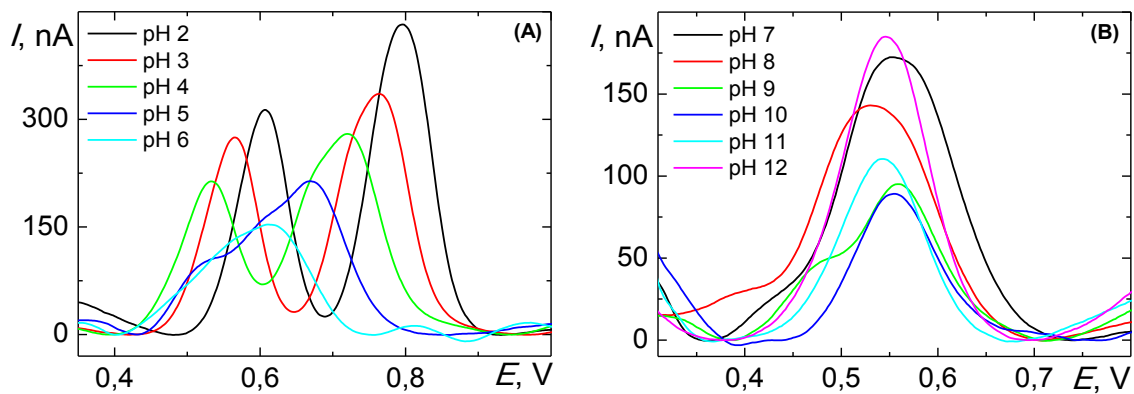
Obr. 3.11 Závislosti (●) potenciálu píkuv E_p a (○) výšok prúdov píku I_p $0,1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ HVA na pH na nemodifikovanej GC elektróde.

Vplyv pH prostredia na elektrochemické správanie VMA na nemodifikovanej GC elektróde je taktiež vyjadrený v tabuľkovej podobe s uvedenými hodnotami potenciálov E_p a prúdov píkuv I_p (**Tab. 3.8**), i v podobe spracovania DP voltamogramov do príslušného obrázku (**Obr. 3.12**) a 3D grafu (**Obr. 3.13**). VMA, obdobne ako HVA, vykazuje najlepšie voltametrické odozvy v prostredí o kyslých hodnotách pH 2,0 a 3,0, kedy obe píky, ktoré táto látka poskytuje, sú najvyššie a rozdelené až na prúd základného elektrolytu. S ďalším posunom pH k vyšším hodnotám však dochádza k čoraz horšiemu rozdeleniu týchto dvoch píkuv, postupne k ich zlievaniu a k zhoršenému, deformovanému charakteru nameraných kriviek. V bázičkom prostredí sa oxidácia VMA prejavuje vznikom už len jedného píku. Okrem toho, s rastúcim pH je možné pozorovať i klesajúcu tendenciu výšok prúdov píkuv, a to až do hodnoty pH 10,0, v prostredí o pH 11,0 a 12,0 prúd jediného píku VMA porástol.

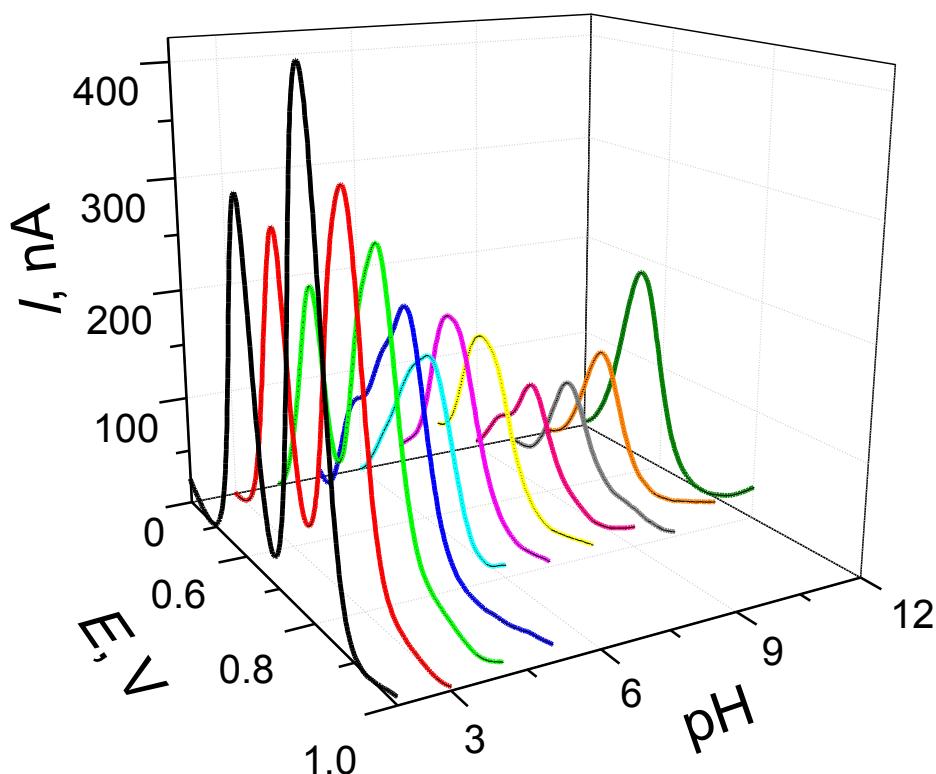
Tab. 3.8 Potenciály E_p a prúdy píkov I_p 0,1 mmol·l⁻¹ VMA v BR pufri v rozmedzí pH 2,0 – 12,0. Namerané metódou DPV na nemodifikovanej GC elektróde.

pH	E_{p1} (mV)	I_{p1} (nA)	E_{p2} (mV)	I_{p2} (nA)
2,0	608	298,5	796	418,8
3,0	566	254,6	764	315,9
4,0	534	168,6	720	234,5
5,0	~515	^a	670	214,0
6,0	-	-	612	153,8
7,0	-	-	552	172,9
8,0	-	-	530	143,6
9,0	-	-	558	95,3
10,0	-	-	554	89,4
11,0	-	-	542	111,2
12,0	-	-	546	185,1

^a pík ťažko kvantifikovateľný



Obr. 3.12 DP voltamogramy 0,1 mmol·l⁻¹ VMA v BR pufri v rozmedzí pH (A) 2,0 – 6,0 a (B) 7,0 – 12,0 namerané na nemodifikovanej GC elektróde.



Obr. 3.13 3D zobrazenie DP voltamogramov 0,1 mmol·l⁻¹ VMA v BR pufri v rozmedzí pH 2,0 – 12,0 nameraných na nemodifikovanej GC elektróde.

Na základe týchto meraní boli pripravené grafy závislostí potenciálov oboch pík E_{p1} a E_{p2} na pH (**Obr. 3.14 A**) i prúdov pík I_{p1} a I_{p2} VMA na pH (**Obr. 3.14 B**). Pre prvý pík je pozorovaná linearita závislosti E_{p1} na pH v rozsahu pH 2,0 – 4,0, teda v prostredí, v ktorom je ho možné jednoznačne a spoľahlivo kvantifikovať, v prípade druhého píku nachádzame lineárnu závislosť E_{p2} na pH v rozmedzí hodnôt pH 2,0 – 8,0. Pre tieto lineárne závislosti platia nasledujúce rovnice 8 a 9:

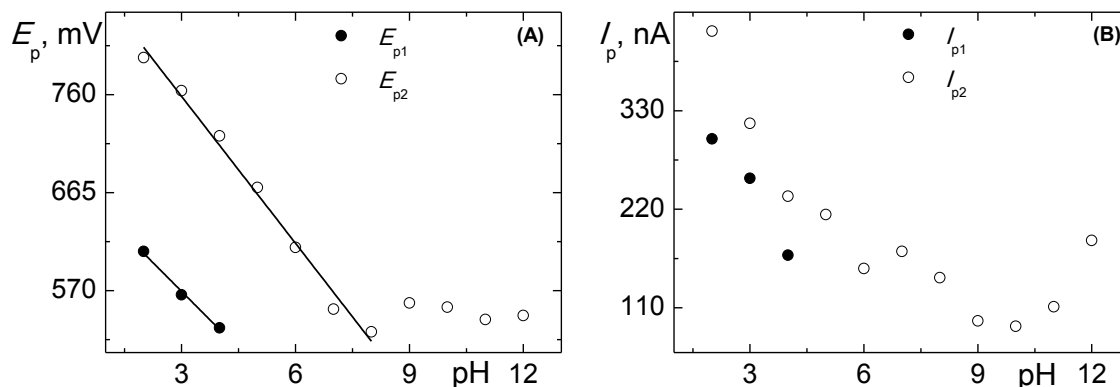
$$E_{p1} \text{ (mV)} = (-37 \pm 3) \cdot \text{pH} + (680 \pm 9) \quad (R = 0,994) \quad (8)$$

pre prvý pík v rozsahu 2,0 – 4,0 a

$$E_{p2} \text{ (mV)} = (-48 \pm 2) \cdot \text{pH} + (901 \pm 11) \quad (R = 0,994) \quad (9)$$

pre druhý pík v rozsahu pH 2,0 – 8,0.

Smernice týchto priamok naznačujú, že počas anodickej oxidácie VMA na nemodifikovanej GC elektróde sa neuplatňuje ekvivalentný počet protónov a elektrónov.



Obr. 3.14 Závislosti (A) potenciálov pík E_{p1} a E_{p2} a (B) výšok prúdov pík I_{p1} a I_{p2} 0,1 mmol·l⁻¹ VMA na pH na nemodifikovanej GC elektróde. Legenda: (●) 1. pík, (○) 2. pík.

Z uvedených zistení plynie, že voltametrická odozva oboch látok je významným spôsobom ovplyvnená pH prostredím, v ktorom sa vyskytujú, čo pravdepodobne súvisí s pK_a hodnotami¹¹¹ disociácie karboxylovej skupiny (4,35 pre HVA a 3,44 pre VMA) a hydroxylovej skupiny na aromatickom skelete (10,34 v prípade HVA a 9,93 pre VMA). Kyslé prostredie o pH 2,0 a 3,0, kedy sa obe študované látky vyskytujú vo svojej neionizovanej podobe, je pre ich stanovenie najvhodnejšie, pretože poskytujú píky najlepších tvarov a s najvyššími hodnotami prúdov. Z tohto dôvodu bol ako základný elektrolyt zvolený 0,1 mol·l⁻¹ fosfátový pufor o pH 3,0.

Na anodicky aktivovanej BDD elektróde došlo k rovnakému odhaleniu¹, kyslé prostredie i na tomto type uhlíkovej elektródy je pre stanovenie HVA a VMA najvyhovujúcejšie. Zaujímavé sú rozdiely medzi týmito elektródovými materiálmi, a to predovšetkým v potenciáloch E_p a počte pík, čo ukazuje i tabuľka (**Tab. 3.9**). Oxidácia študovaných metabolitov na BDD elektróde prebieha pri výrazne vyšších potenciáloch, v prípade HVA +805 až +1010 mV, u VMA +870 až +1120 mV, než na GC elektróde, kde sú tieto hodnoty pre HVA v rozmedzí +210 až +630 mV, a u VMA +530 až +800 mV. S nárastom pH sa v DP voltamogramoch HVA nameraných na BDD elektróde postupne objavujú aj ďalšie píky, na GC elektróde v celom skúmanom

rozsahu pH poskytuje HVA len jeden pík. Naopak, pri oxidácii VMA na GC elektróde sa v rozmedzí pH 2,0 – 4,0 objavujú dva vzájomne dobre rozlíšiteľné píky, posunom k vyšším hodnotám pH sa počet znižuje na jeden pík. Na BDD elektróde sa oxidácia VMA prejavuje jedným píkom, len v rozmedzí pH 10,0 – 12,0 sa v DP voltamogramoch zaznamenali nepatrné, ťažko kvantifikovateľné druhé píky.

Tab. 3.9 Porovnanie potenciálov E_p a počtu oxidačných píkov HVA a VMA (každá o $c = 0,1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) zaznamenaných v DP voltamogramoch nameraných v prostredí BR pufru v rozsahu hodnôt pH 2,0 – 12,0 na nemodifikovanej GCE a anodicky aktivovanej BDD elektróde.

	GC elektróda		BDD elektróda ¹	
	HVA	VMA	HVA	VMA
Počet píkov	1 (pH 2 – 12)	2 (pH 2 – 5) 1 (pH 6 – 12)	1 (pH 2 – 4) 2 (pH 5 – 9) 3 (pH 10 – 12)	1 (pH 2 – 9) 2 (pH 10 – 12)
E_p (mV)	+210 až +630	+530 až +800	+805 až +1010	+870 až +1120

Na ďalších skúmaných elektródach na báze uhlíku bolo pozorované správanie HVA a VMA obdobné tomu, ktoré bolo odhalené na GC elektróde v rámci tejto práce. Je teda nachádzaná významná odlišnosť v elektrochemickej odozve HVA a VMA na BDD elektróde v porovnaní s inými študovanými uhlíkovými materiálmi.

Na kompozitných uhlíkových filmových elektródach poskytuje HVA v celom študovanom rozsahu pH 2,0 – 12,0 jeden anodický pík¹⁶, rovnako ako aj na uhlíkovej pastovej elektróde¹⁸. Dva píky VMA boli pozorované na uhlíkovom kompozitnom filme až do hodnoty pH 11,0 (cit¹⁶), na uhlíkovej pastovej elektróde sa oxidácia VMA prejavuje dvoma píkmami v kyslom prostredí, k splývaniu do jedného píku dochádza na tomto type elektródy v neutrálnom a bázičkom prostredí¹⁸.

Elektrooxidácia VMA boli bližšie preskúmaná i na elektróde z pyrolitického grafitu¹⁴, kde VMA poskytovala opäť dva oxidačné píky a HVA len jeden, v skúmanom rozsahu pH 0 až 7,0. Príčinou rozdielu vo voltametrických odozvách je prítomnosť

hydroxylovej skupiny v alfa polohe v štruktúre VMA, vďaka ktorej je umožnená rearomatizácia molekuly skrz tautomerizáciu po prvom oxidačnom kroku. Mechanizmus oxidácie VMA pokračuje cez jej dekarboxyláciu k tvorbe vanilínu, ktorý je takisto následne oxidovaný, čoho výsledkom je práve vznik druhého píku (schéma príslušného mechanizmu je uvedené na **Obr. 1.4** v Kap. 1.2.2). Ak alkoholová skupina v polohe alfa chýba, čo je aj prípad HVA, je rýchlosť rearomatizačného kroku omnoho pomalšia a požaduje ďalšiu molekulu vody pre tvorbu vanilínu. A je preto pravdepodobné, že práve nízka rýchlosť tohto druhého oxidačného kroku spôsobuje, že pri oxidácii HVA nie sú pozorované ďalšie píky.

3.4 Voltametrické štúdium HVA a VMA na modifikovaných GC elektródach

Tri rôzne spôsoby modifikácie GC elektródy boli vyskúšané s cieľom zvýšiť voltametrickú odozvu poskytovanú študovanými biomarkermi. Príprava použitých modifikovaných elektród, MWCNTs/GCE, Nafion/GCE a PNR/GCE, je uvedená v Kap. 2.3.2.

Už prvotné predbežné merania na GC elektróde modifikovanej MWCNTs odhalili nevhodnosť tejto modifikácie pre elektrochemické štúdium a stanovenie HVA a VMA, keďže prúdy pík daných zlúčenín na tomto type modifikovanej elektródy dosahovali hodnôt len niekoľko desiatok nA, boli vyše 50-krát nižšie v porovnaní s prúdmi pík dosahovanými na nemodifikovanej GC elektróde.

Čo sa týka ostatných modifikovaných elektród, najprv boli premerané šesť za sebou nadväzujúce cyklické voltamogramy $0,1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ HVA (**Obr. 3.15 A, C, E**) a $0,1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ VMA (**Obr. 3.15 B, D, F**) v prostredí $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ fosfátového pufru o pH 3,0 v potenciálovom rozsahu od 0 V do +1,9 V na nemodifikovanej GC elektróde (**Obr. 3.15 A, B**) a modifikovanej Nafion/GCE (**Obr. 3.15 C, D**) a PNR/GCE (**Obr. 3.15 E, F**). Pre obe látky na všetkých troch elektródových povrchoch platí, že ich signál sa v anodickej oblasti s rastúcim počtom scanov znižuje, pričom najvýraznejší pokles je pozorovaný vždy medzi prvým a druhým nameraným cyklom, a taktiež že ich katodické,

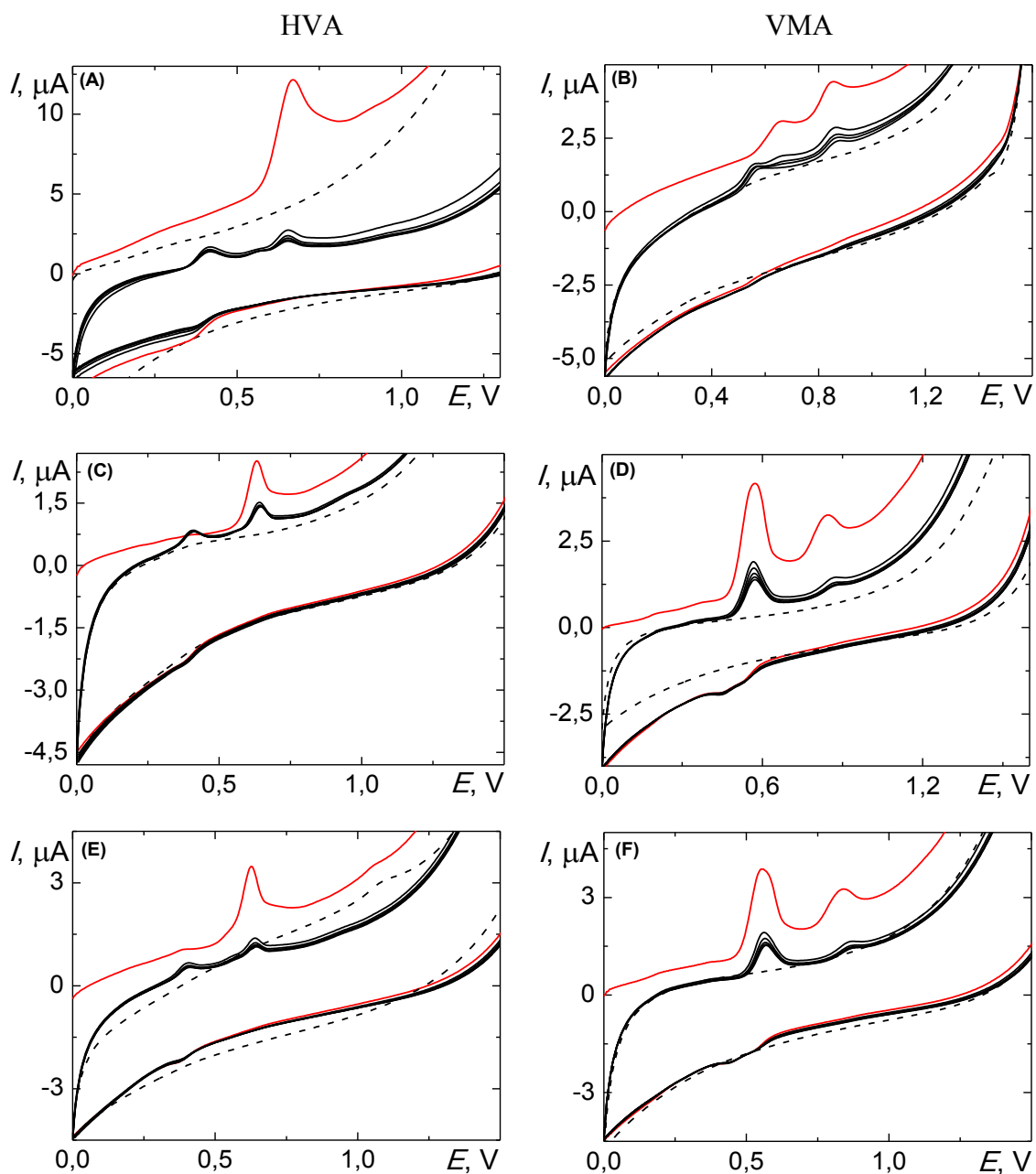
omnoho nižšie píky, podliehajú v priebehu šiestich následných scanov minimálnym nevýznamným zmenám.

V prípade HVA je pri prvom scane pozorovaný vždy len jeden anodický pík pri potenciáli E_p : +0,670 V na nemodifikovanej GC elektróde, +0,630 V na Nafion/GCE a +0,625 V na PNR/GCE, počet píkov sa ale zvyšuje na dva pri všetkých ďalších cykloch, pričom tento druhý pík sa vyskytuje pri týchto nasledujúcich potenciáloch E_p : +0,415 V na nemodifikovanej GCE, +0,410 V na Nafion/GCE a +0,405 V na PNR/GCE.

Metódou CV bola študovaná HVA na GC elektróde modifikovanej polymérom alizarínovej červene S^{20} . Podľa tejto štúdie je pri ireverzibilnej oxidácii HVA vo vodnom roztoku generovaný reverzibilný redoxný pár 3,4-dihydroxyfenyloctová kyselina / 4-aceto-*o*-chinón. Pri prvom scane, kedy je v roztoku prítomná len HVA, jej elektrooxidácia vedie k tvorbe jedného anodického píku za vzniku 4-aceto-*o*-chinónu, ktorý je pri spätnom katodickom scane redukovaný na 3,4-dihydroxyfenyloctovú kyselinu, ktorá sa môže v priebehu ďalších scanov opätovne oxidovať a spôsobovať vznik ďalšieho píku.

VMA poskytuje na všetkých elektródach vždy dva anodické oxidačné píky, a to pri nasledujúcich hodnotách potenciálov E_{p1} a E_{p2} : +0,665 V a +0,885 V na nemodifikovanej GC elektróde, +0,575 V a +0,845 V na Nafion/GCE, +0,555 V a +0,840 V na PNR/GCE.

Je teda možné konštatovať, že modifikácia povrchu GC elektródy vedie k posunu potenciálu študovaných látok k nižším hodnotám, pričom tento trend je výraznejší pre VMA: rozdiel v potenciáloch medzi GC elektródou a Nafion/GCE je 90 mV pre prvý pík a 40 mV v prípade druhého píku, pri porovnaní nemodifikovanej GCE a PNR/GCE rozdiel potenciálov činí 110 mV u prvého a 45 mV u druhého píku.

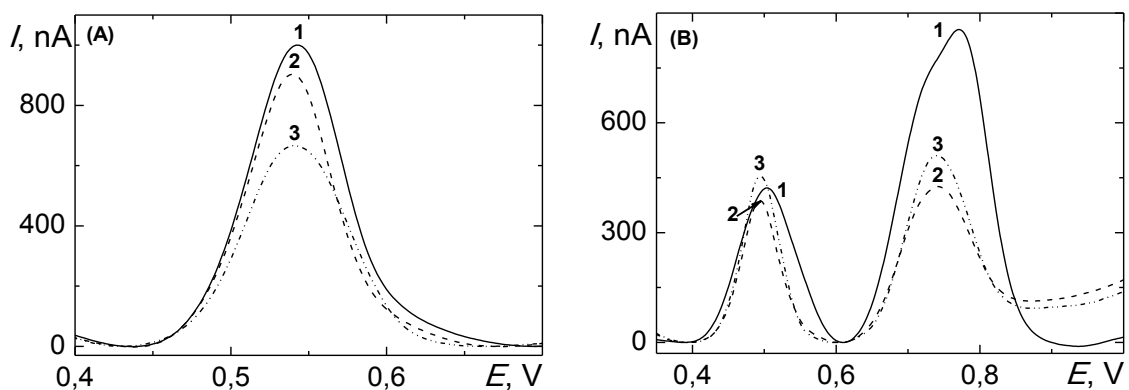


Obr. 3.15 Cyklické voltamogramy (A, C, E) $0,1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ HVA a (B, D, F) $0,1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ VMA v prostredí $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ fosfátového pufru o pH 3,0 namerané na (A, B) nemodifikovanej GCE, (C, D) Nafion/GCE a (E, F) PNR/GCE. Zobrazených šesť následných scanov nameraných rýchlosťou polarizácie $\nu = 500 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Červenou farbou zobrazený prvý scan. Čiarkovane je znázornený základný elektrolyt.

Následne v rámci porovnania nemodifikovanej GC elektródy a jej modifikovaných obmien, Nafion/GCE a PNR/GCE, došlo k nameraniu i DP voltamogramov 0,1 mmol·l⁻¹ HVA (**Obr. 3.16 A**) a 0,1 mmol·l⁻¹ VMA (**Obr. 3.16 B**) v prostredí 0,1 mol·l⁻¹ fosfátového pufru o pH 3,0. Parametre týchto pík, t.j. hodnoty ich potenciálov E_p a veľkosti prúdov I_p , sú zhrnuté v tabuľke (**Tab. 3.10**).

Poloha píku HVA a prvého oxidačného píku VMA sa v závislosti na elektródovom materiáli líši len minimálne, iba u druhého píku VMA dochádza na modifikovaných povrchoch k zníženiu potenciálu o 30 mV v porovnaní s nemodifikovanou GC elektródou.

Významnejšie rozdiely sú však nachádzané vo veľkosti prúdov nameraných píkov. Nemodifikovaná GC elektróda poskytla v prípade 0,1 mmol·l⁻¹ HVA najvyššie prúdy píkov, modifikované varianty bohužiaľ nepriniesli žiadne zlepšenie s ohľadom na veľkosť nameraných signálov, v prípade PNR/GCE bol dokonca zaznamenaný pokles prúdu píku HVA o viac než 330 nA. Neboli pozorované výrazné rozdiely v prúdoch prvého oxidačného píku VMA, len mierne zvýšenie o 30 nA na PNR modifikovanej GCE, väčšie odlišnosti sú opäť nachádzané u druhého oxidačného píku, ktorý dosahuje najvyšších hodnôt na nemodifikovanej GC elektróde, a jeho hodnota klesá o 485 nA na Nafion/GCE a o približne 391 nA na PNR/GCE.



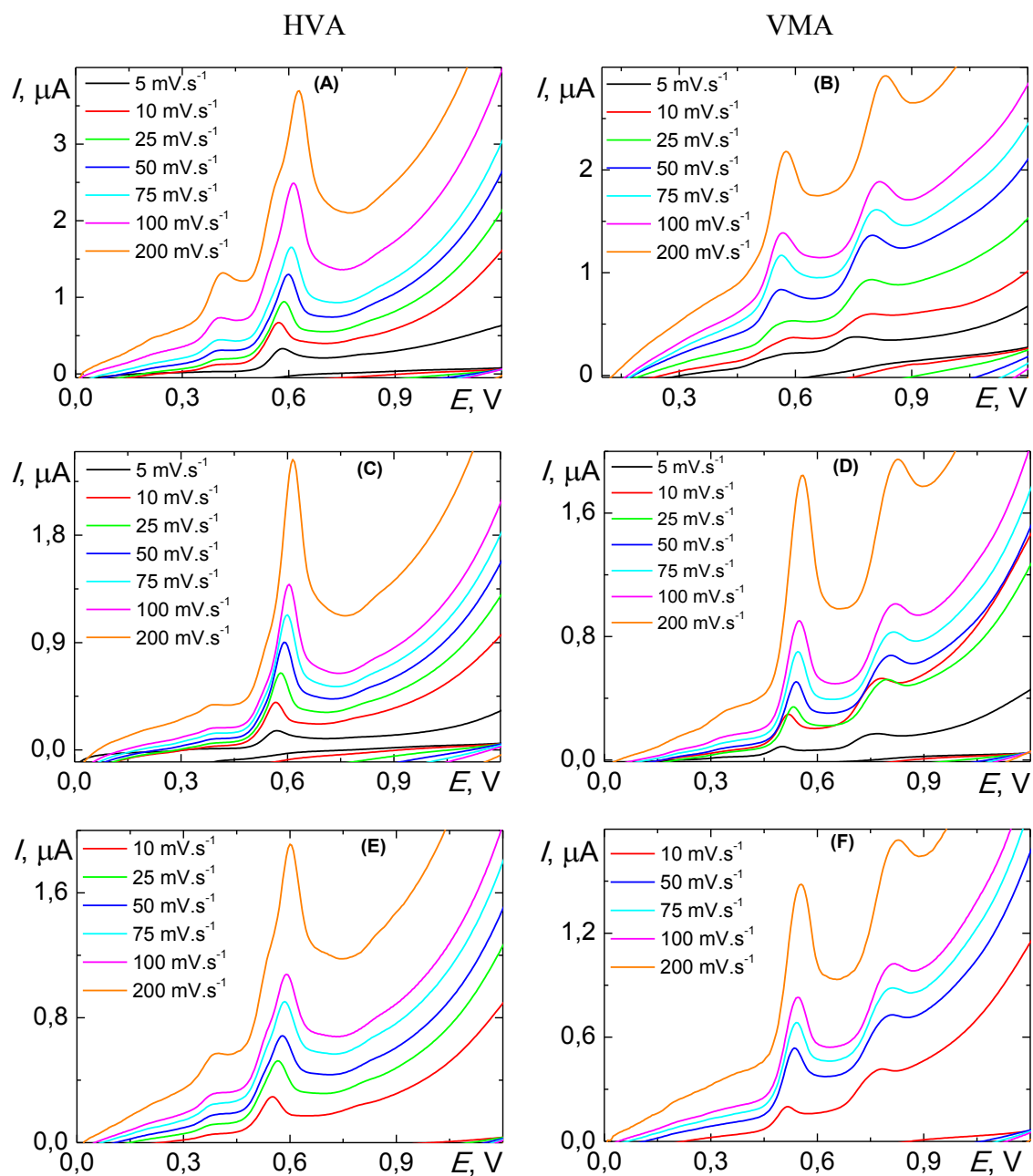
Obr. 3.16 DP voltamogramy (A) 0,1 mmol·l⁻¹ HVA a (B) 0,1 mmol·l⁻¹ VMA v 0,1 mol·l⁻¹ fosfátovom pufru o pH 3,0 namerané na (1) nemodifikovanej GCE, (2) Nafion/GCE a (3) PNR/GCE.

Tab. 3.10 Porovnanie potenciálov píkov E_p a prúdov píkov I_p HVA a VMA (každá o $c = 0,1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) v prostredí $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ fosfátového pufru o pH 3,0 nameraných DPV metódou na nemodifikovanej GCE, a modifikovanej Nafion/GCE a PNR/GCE.

Analyt	Elektroda	E_{p1} (mV)	I_{p1} (nA)	E_{p2} (mV)	I_{p2} (nA)
HVA	GCE	542	999,7	-	-
	Nafion/GCE	540	903,7	-	-
	PNR/GCE	540	666,2	-	-
VMA	GCE	504	422,1	770	860,0
	Nafion/GCE	494	388,0	740	374,8
	PNR/GCE	494	454,2	738	469,4

3.5 Cyklická voltametria: riadenie oxidácie HVA a VMA

K preskúmaniu riadenia oxidácie študovaných látok na nemodifikovanej GC elektróde, a modifikovanej Nafion/GCE a PNR/GCE, boli zmerané cyklické voltamogramy $0,1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ HVA (**Obr. 3.17 A, C, E**) a $0,1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ VMA (**Obr. 3.17 B, D, F**) v prostredí $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ fosfátového pufru o pH 3,0 pri rôznej rýchlosti polarizácie povrchu v v rozsahu $5 - 2000 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ (grafické znázornenie je pre prehľadnosť len v rozmedzí $v = 5 - 200 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$), kde pre obe látky môžeme pozorovať so zvyšujúcou sa rýchlosťou polarizácie elektród nárast veľkosti prúdov píkov a mierny posun potenciálov smerom ku kladnejším hodnotám.



Obr. 3.17 Cyklické voltamogramy (A, C, E) $0,1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ HVA a (B, D, F) $0,1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ VMA v prostredí $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ fosfátového pufru o pH 3,0 pri rýchlosti polarizácie povrchu $\nu = 5 - 200 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ namerané na (A, B) nemodifikovanej GC elektróde, (C, D) Nafion/GCE a (E, F) PNR/GCE.

Na základe týchto meraní boli zostrojené odpovedajúce závislosti $\log I_p$ na $\log v$, keďže hodnota ich smernice indikuje spôsob riadenia príslušného deja, ak nadobúda hodnôt blízkych 1, ide o dej kontrolovaný adsorpciou, o difúziou riadený dej sa jedná v prípade hodnôt pohybujúcich sa okolo 0,5. Okrem toho boli skonštruované ďalšie závislosti, lineárna závislosť prúdu píku I_p na rýchlosti polarizácie v potvrdzuje adsorpčne riadený dej, linearita závislosti prúdu píku I_p na druhej odmocnine rýchlosti polarizácie $v^{1/2}$ značí dej kontrolovaný difúziou. Pomocou nich prebehlo vyšetovanie k odhaleniu spôsobu riadenia anodickej oxidácie oboch látok na daných elektródových povrchoch, pričom k výpočtom príslušných závislostí boli využité vždy nižšie rýchlosti scanu.

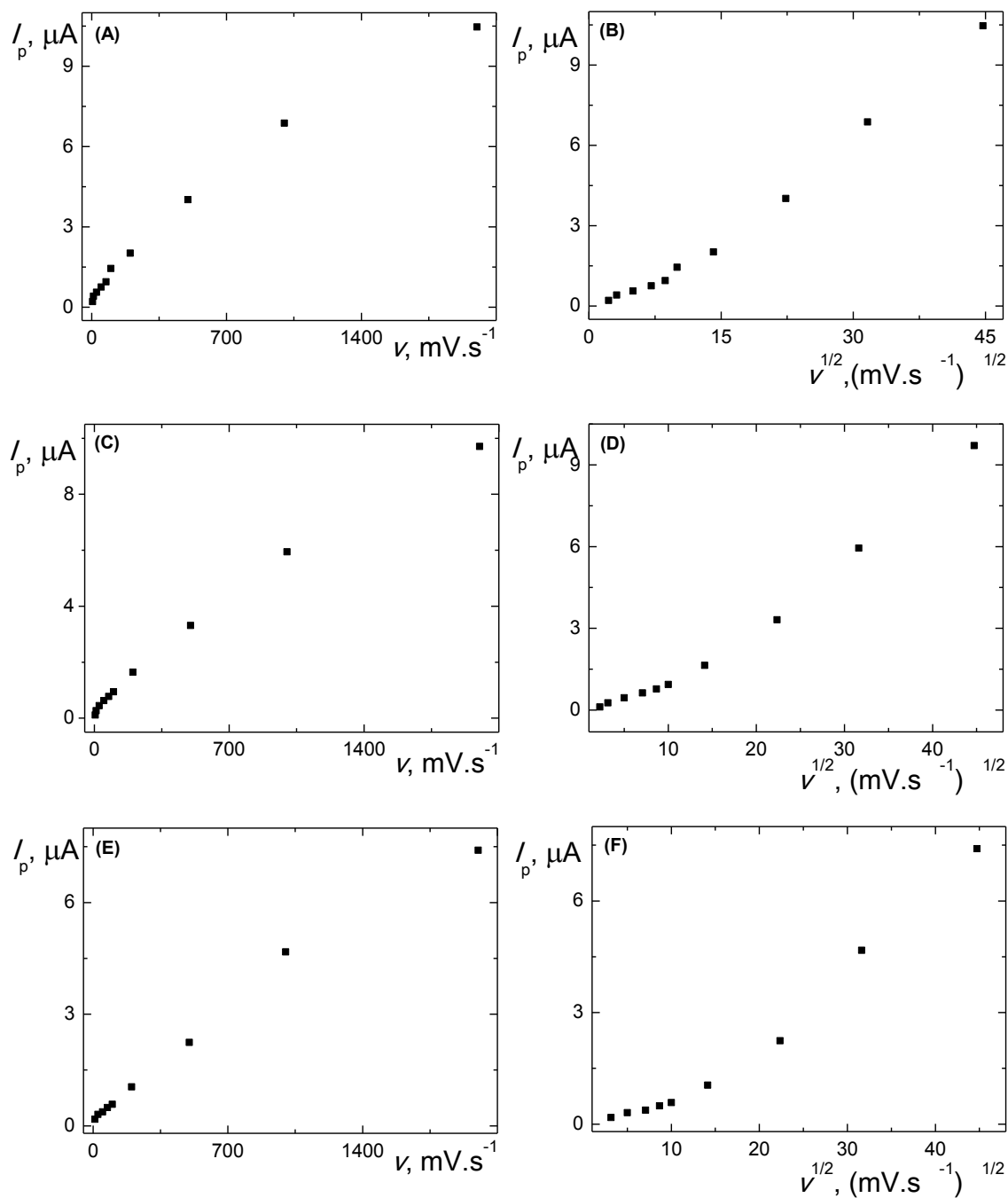
Ďalej sú zobrazené odpovedajúce grafy týchto závislostí pre HVA (**Obr. 3.18**) a VMA (**Obr. 3.19**) v celom skúmanom rozsahu rýchlostí v , a na základe ich podobného priebehu je možné konštatovať, že pre danú kyselinu sa na všetkých troch typoch elektród uplatňuje rovnaký spôsob riadenia jej oxidácie. Príslušné parametre lineárnych závislostí sú uvedené v tabuľkách, zvlášť pre HVA (**Tab. 3.11**), a prvý a druhý pík VMA (**Tab. 3.12** a **Tab. 3.13**).

Smernice závislostí $\log I_p$ na $\log v$ sa v prípade HVA na všetkých študovaných elektródových materiáloch pohybujú v rozmedzí 0,56 až 0,59 a indikujú difúzne riadený oxidačný proces, čo potvrdil aj lineárny priebeh závislostí I_p na $v^{1/2}$.

Lineárne závislosti prúdu prvého oxidačného píku VMA I_p na rýchlosti polarizácie v a hodnoty smerníc $\log I_p$ na $\log v$ blížiac sa k hodnote 1, odhaľujú, že v tomto prípade ide o dej kontrolovaný adsorpciou na všetkých elektródach, t.j. nemodifikovanej GC elektróde, Nafion/GCE i PNR/GCE. Naopak, pri riadení deja oxidácie druhého píku VMA sa pravdepodobne uplatňuje predovšetkým difúzia.

Tab. 3.11 Parametre priamok lineárnych závislostí 0,1 mmol·l⁻¹ HVA v 0,1 mol·l⁻¹ fosfátovom pufri o pH 3,0, s uvedeným rozsahom rýchlostí polarizácie ν príslušnej elektródy.

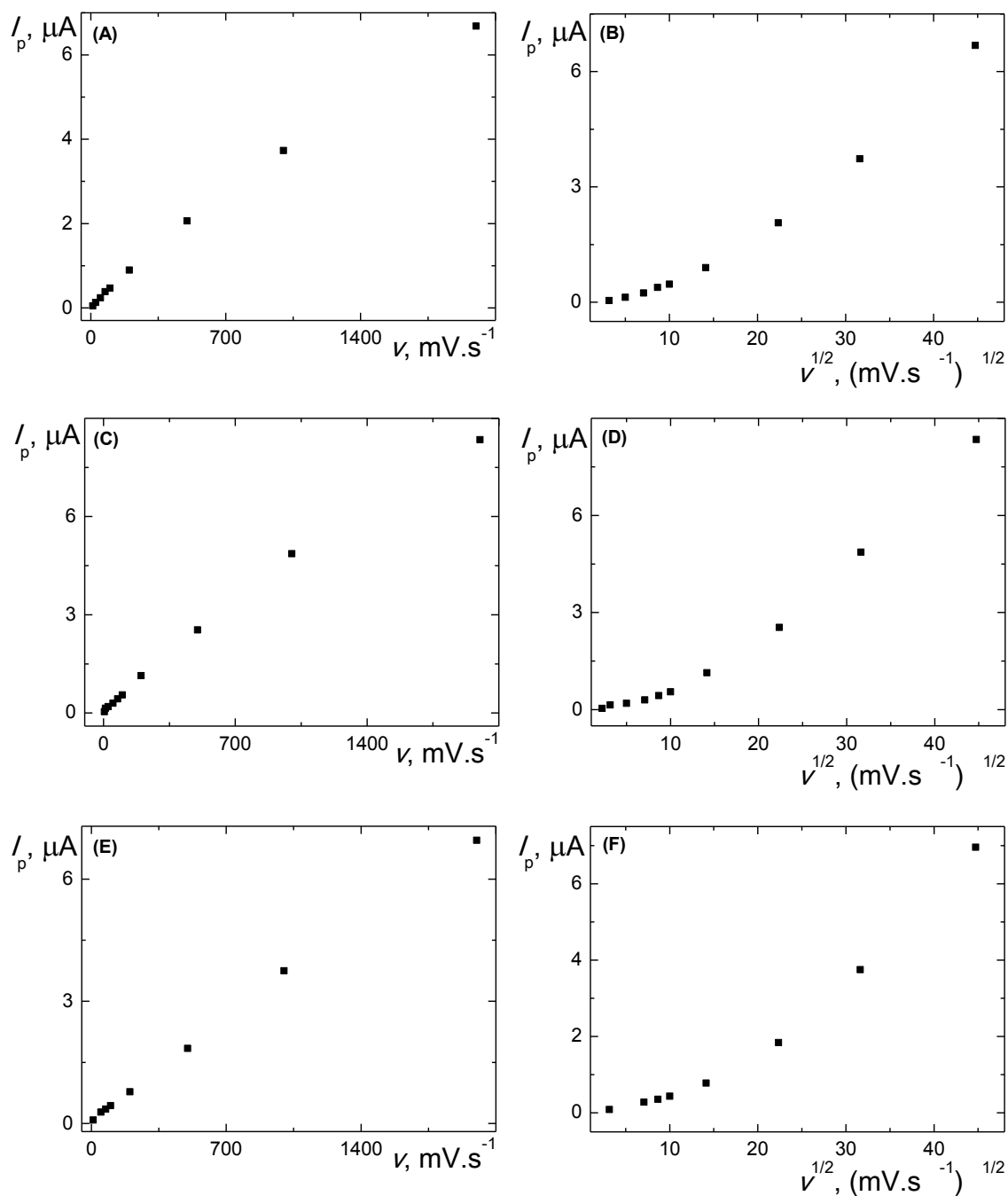
Elektróda	Závislosť	Rozsah rýchlostí polarizácie ν (mV·s ⁻¹)	Úsek	Smernica	R
GCE	$\log I_p$ na $\log \nu$	5 – 200	$1,95 \pm 0,07$	$0,58 \pm 0,04$	0,984
	I_p na $\nu^{1/2}$	5 – 75	$13,9 \pm 46,0$ nA	$107,2 \pm 8,0$ nA·s ^{1/2} ·mV ^{-1/2}	0,989
Nafion/GCE	$\log I_p$ na $\log \nu$	10 – 200	$1,82 \pm 0,06$	$0,59 \pm 0,03$	0,993
	I_p na $\nu^{1/2}$	5 – 100	$-82,3 \pm 27,9$ nA	$101,2 \pm 4,2$ nA·s ^{1/2} ·mV ^{-1/2}	0,996
PNR/GCE	$\log I_p$ na $\log \nu$	10 – 200	$1,67 \pm 0,08$	$0,56 \pm 0,04$	0,984
	I_p na $\nu^{1/2}$	10 – 100	$2,8 \pm 27,2$ nA	$56,6 \pm 3,8$ nA·s ^{1/2} ·mV ^{-1/2}	0,991



Obr. 3.18 Závislosť (A, C, E) prúdu píku I_p na rýchlosti polarizácie v a (B, D, F) prúdu píku I_p na druhej odmocnine rýchlosti polarizácie $v^{1/2}$ pre $0,1 \text{ mmol.l}^{-1}$ HVA v prostredí $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ fosfátového pufru o pH 3,0 na (A, B) nemodifikovanej GC elektróde, (C, D) Nafion/GCE a (E, F) PNR/GCE.

Tab. 3.12 Parametre priamok lineárnych závislostí pre 1. pík $0,1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ VMA v $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ fosfátovom pufri o pH 3,0, s uvedeným rozsahom rýchlostí polarizácie v príslušnej elektródy.

Elektróda	Závislosť	Rozsah rýchlostí polarizácie v ($\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$)	Úsek	Smernica	R
GCE	$\log I_p$ na $\log v$	10 – 200	$0,69 \pm 0,05$	$0,99 \pm 0,03$	0,998
	I_p na v	10 – 200	$19,0 \pm 12,1 \text{ nA}$	$4,5 \pm 0,1 \text{ nA}\cdot\text{s}\cdot\text{mV}^{-1}$	0,998
Nafion/GCE	$\log I_p$ na $\log v$	5 – 200	$1,01 \pm 0,05$	$0,88 \pm 0,03$	0,998
	I_p na v	5 – 200	$42,9 \pm 17,7 \text{ nA}$	$5,4 \pm 0,2 \text{ nA}\cdot\text{s}\cdot\text{mV}^{-1}$	0,996
PNR/GCE	$\log I_p$ na $\log v$	10 – 200	$1,19 \pm 0,03$	$0,73 \pm 0,02$	0,999
	I_p na v	10 – 200	$76,9 \pm 17,1 \text{ nA}$	$3,6 \pm 0,2 \text{ nA}\cdot\text{s}\cdot\text{mV}^{-1}$	0,996



Obr. 3.19 Závislosť (A, C, E) prúdu píku I_p na rýchlosti polarizácie v a (B, D, F) prúdu píku I_p na druhej odmocnine rýchlosti polarizácie $v^{1/2}$ pre $0,1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ VMA v prostredí $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ fosfátového pufru o pH 3,0 na (A, B) nemodifikovanej GC elektróde, (C, D) Nafion/GCE a (E, F) PNR/GCE.

Tab. 3.13 Parametre priamok lineárnych závislostí pre 2. pík $0,1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ VMA v $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ fosfátovom pufri o pH 3,0, s uvedeným rozsahom rýchlostí polarizácie v príslušnej elektródy.

Elektróda	Závislosť	Rozsah rýchlostí polarizácie v ($\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$)	Úsek	Smernica	R
GCE	$\log I_p$ na $\log v$	5 – 200	$1,38 \pm 0,05$	$0,62 \pm 0,03$	0,993
	I_p na $v^{1/2}$	5 – 200	$-38,9 \pm 16,9 \text{ nA}$	$45,0 \pm 2,1 \text{ nA}\cdot\text{s}^{1/2}\cdot\text{mV}^{-1/2}$	0,994
Nafion/GCE	$\log I_p$ na $\log v$	25 – 200	$1,12 \pm 0,21$	$0,64 \pm 0,12$	0,939
	I_p na $v^{1/2}$	25 – 100	$18,9 \pm 17,7 \text{ nA}$	$19,9 \pm 2,2 \text{ nA}\cdot\text{s}^{1/2}\cdot\text{mV}^{-1/2}$	0,981
PNR/GCE	$\log I_p$ na $\log v$	50 – 200	$0,70 \pm 0,09$	$0,77 \pm 0,04$	0,995
	I_p na $v^{1/2}$	50 – 200	$-108,3 \pm 28,8 \text{ nA}$	$28,9 \pm 2,4 \text{ nA}\cdot\text{s}^{1/2}\cdot\text{mV}^{-1/2}$	0,989

Nasledujúca tabuľka (**Tab. 3.14**) zhŕňa a porovnáva rôzne spôsoby riadenia oxidačného procesu HVA a VMA na nemodifikovanej a Nafionom a PNR modifikovanej GC elektróde, a je doplnená údajmi získanými na anodicky aktivovanej BDD elektróde¹. Oxidácia oboch látok na BDD elektróde v prostredí 0,1 mol·l⁻¹ fosfátového pufru o pH 3,0 je dej výlučne riadený difúziou, čo potvrdzujú nielen hodnoty smerníc závislosti log I_p na log v 0,38 pre HVA a 0,40 pre VMA, ktoré sú blízko teoretickej hodnoty 0,5 pre ideálne difúziou kontrolované deje, ale aj ich lineárne závislosti I_p na $v^{1/2}$.

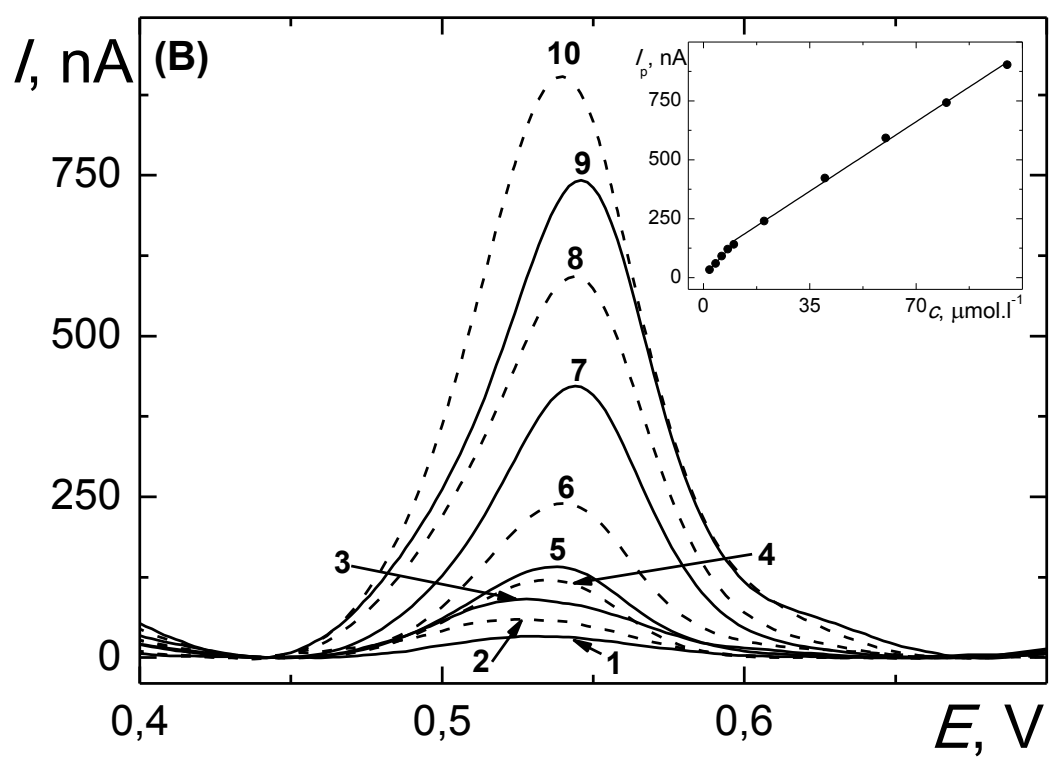
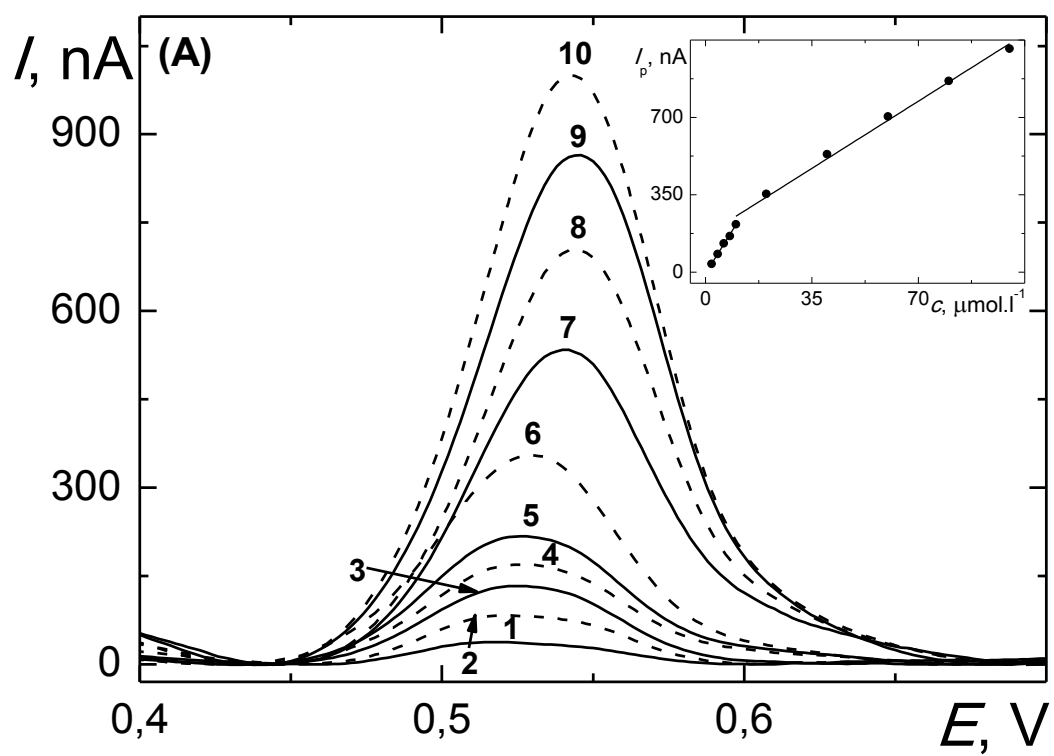
Tab. 3.14 Porovnanie spôsobov riadenia anodickej oxidácie HVA a VMA (každá o $c = 0,1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$) v prostredí 0,1 mol·l⁻¹ fosfátového pufru o pH 3,0 na príslušných elektródových povrchoch.

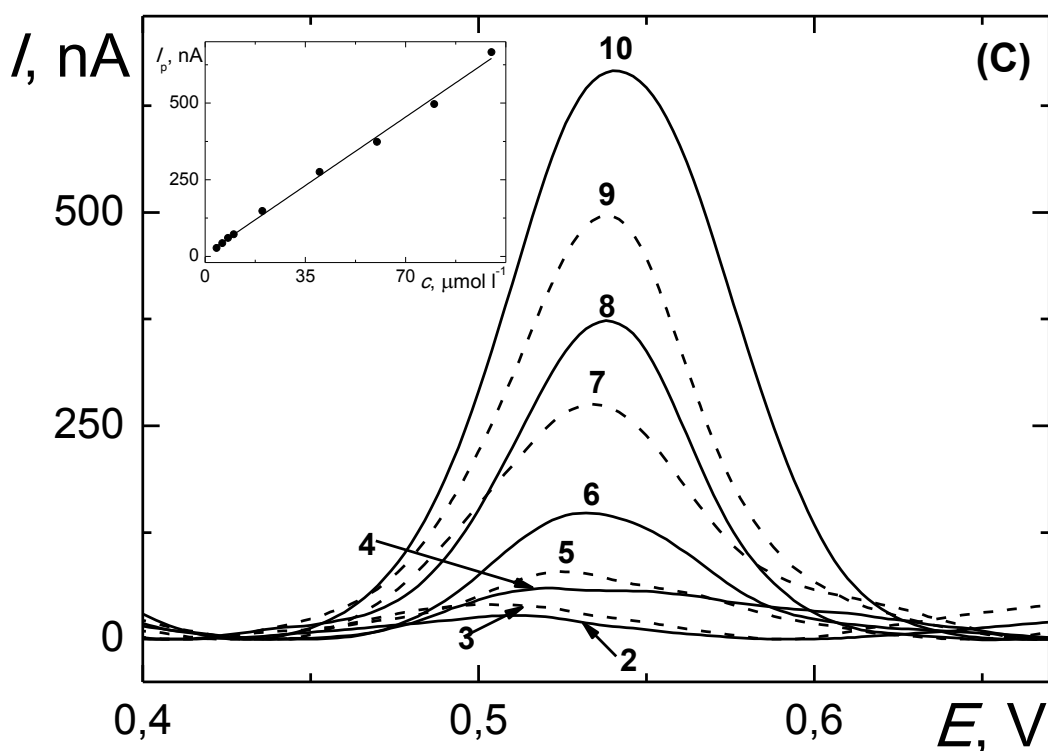
Analyt		nemodifikovaná GCE	Nafion/GCE	PNR/GCE	BDD elektróda ¹
HVA		difúzia	difúzia	difúzia	difúzia
VMA	1. pík	adsorpcia	adsorpcia	adsorpcia	difúzia
	2. pík	difúzia	difúzia	difúzia	-

3.6 Kalibračné závislosti, určenie LOD a LOQ

Kalibračné závislosti oboch skúmaných organických kyselín boli premerané v prostredí 0,1 mol·l⁻¹ fosfátového pufru o pH 3,0 metódou DPV v rozsahu koncentrácií 1 – 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ na GC elektróde, nemodifikovanej i modifikovanej ionomérom Nafionom a farbivom PNR.

Odpovedajúce DP voltamogramy s vloženými grafmi kalibračných závislostí pre HVA (**Obr. 3.20**) a VMA (**Obr. 3.21**) sú znázornené na obrázkoch. Parametre týchto závislostí sú prehľadne zhrnuté v príslušných tabuľkách, spoločne s určenými medzami detekcie a stanoviteľnosti (podľa postupu uvedeného v Kap. 2.3.5), zvlášť pre HVA (**Tab. 3.15**) a VMA (**Tab. 3.16**), doplnené o údaje získané na anodicky aktivovanej BDD elektróde v rámci bakalárskej práce¹.



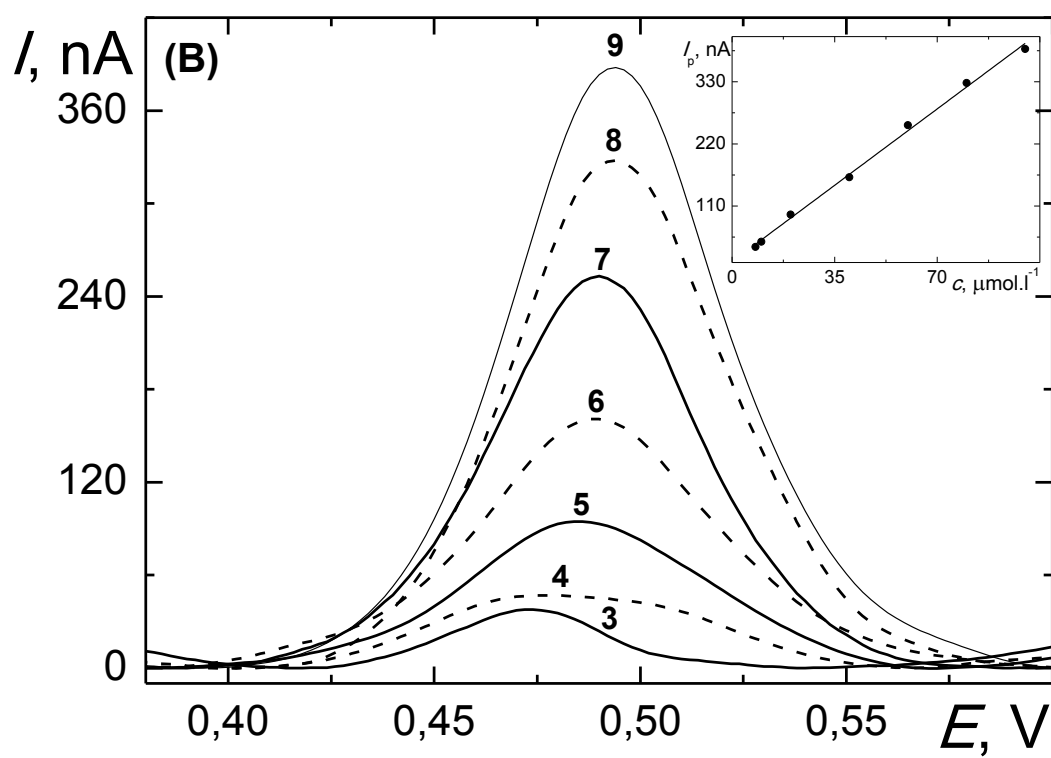
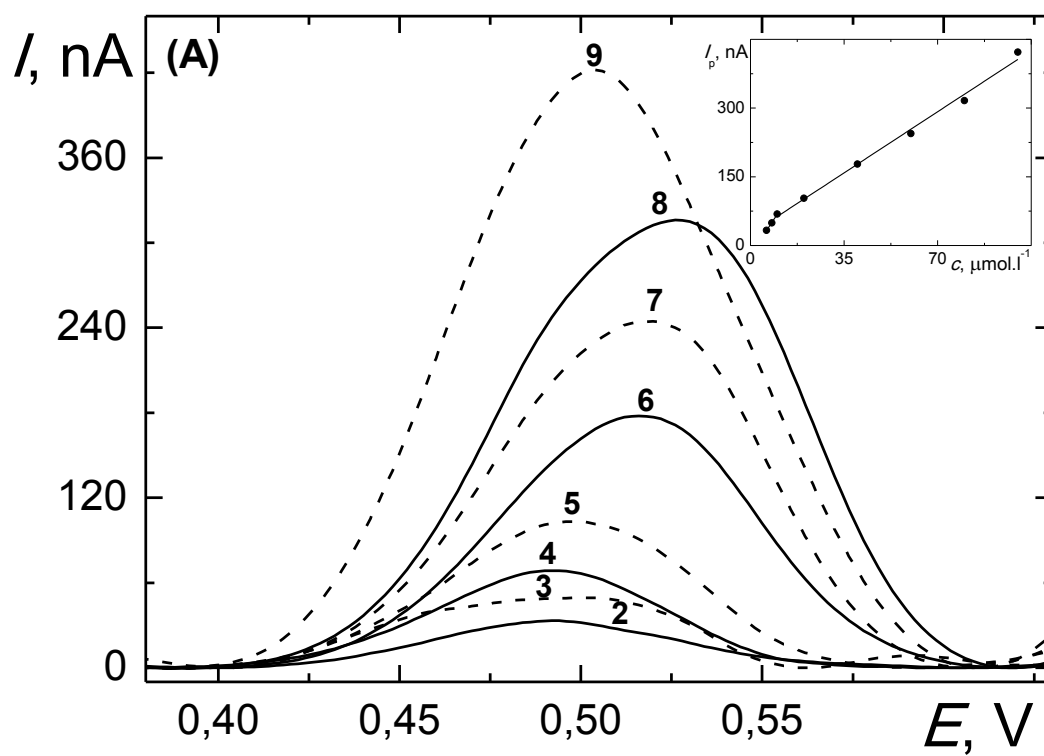


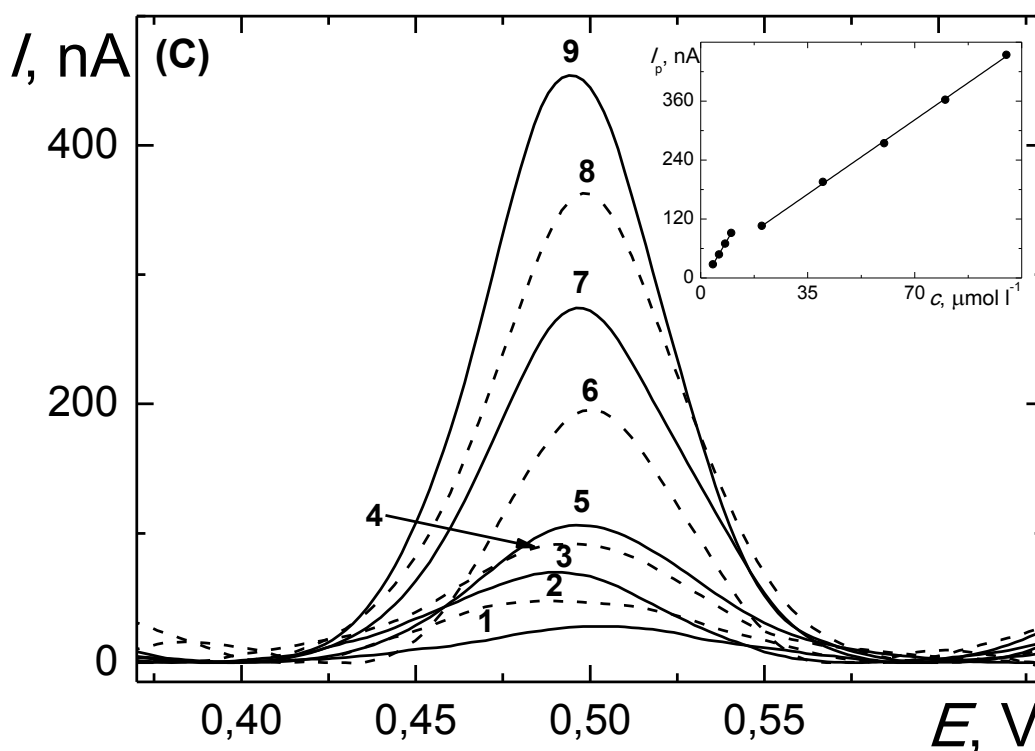
Obr. 3.20 DP voltamogramy HVA v prostredí $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ fosfátového pufru o pH 3,0 namerané na (A) nemodifikovanej GCE, (B) Nafion/GCE a (C) PNR/GCE pri koncentráciách danej kyseliny ($\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$): (1) $2,0 \cdot 10^{-6}$, (2) $4,0 \cdot 10^{-6}$, (3) $6,0 \cdot 10^{-6}$, (4) $8,0 \cdot 10^{-6}$, (5) $1,0 \cdot 10^{-5}$, (6) $2,0 \cdot 10^{-5}$, (7) $4,0 \cdot 10^{-5}$, (8) $6,0 \cdot 10^{-5}$, (9) $8,0 \cdot 10^{-5}$, (10) $1,0 \cdot 10^{-4}$.

Kalibračná závislosť HVA na nemodifikovanej GC elektróde a Nafion/GCE sa rozdeľuje na dva lineárne úseky (**Obr. 3.20 A, B** vložené grafy, **Tab. 3.15**). Limity detekcie a kvantifikácie sú v prípade HVA veľmi obdobné na všetkých použitých elektródových materiáloch, najnižšie hodnoty však boli dosiahnuté na BDD elektróde, a približne dvojnásobne väčšie, teda najvyššie, na GC elektróde modifikovanej polymérom neutrálnej červene (**Tab. 3.15**).

Tab. 3.15 Parametre kalibračných závislostí HVA zistené metódou DPV v prostredí $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ fosfátového pufru o pH 3,0 na rôznych elektródach, spoločne s určenými limitmi detekcie a kvantifikácie.

Elektróda	Rozsah ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	Úsek (nA)	Smernica ($\text{nA}\cdot\mu\text{mol}^{-1}\cdot\text{l}$)	R	LOD ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)
BDD ¹	2 – 100	$-24,1 \pm 4,5$	$6,6 \pm 0,1$	0,999	0,6	1,9
GCE	2 – 10	$-5,7 \pm 4,9$	$22,0 \pm 0,7$	0,998	0,9	3,0
	10 – 100	$166,0 \pm 20,5$	$8,7 \pm 0,3$	0,996		
Nafion/GCE	2 – 10	$6,5 \pm 3,4$	$13,8 \pm 0,5$	0,997	0,8	2,8
	10 – 100	$71,9 \pm 10,8$	$8,4 \pm 0,2$	0,999		
PNR/GCE	4 – 100	$7,8 \pm 7,3$	$6,4 \pm 0,1$	0,998	1,2	4,1





Obr. 3.21 DP voltamogramy VMA v prostredí $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ fosfátového pufru o pH 3,0 namerané na (A) nemodifikovanej GCE, (B) Nafion/GCE a (C) PNR/GCE pri koncentráciách danej kyseliny ($\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$): (1) $4,0 \cdot 10^{-6}$, (2) $6,0 \cdot 10^{-6}$, (3) $8,0 \cdot 10^{-6}$, (4) $1,0 \cdot 10^{-5}$, (5) $2,0 \cdot 10^{-5}$, (6) $4,0 \cdot 10^{-5}$, (7) $6,0 \cdot 10^{-5}$, (8) $8,0 \cdot 10^{-5}$, (9) $1,0 \cdot 10^{-4}$.

Rovnako ako u HVA, aj v prípade VMA sa stretávame s rozdelením kalibračných závislostí na dve lineárne oblasti, a to na nemodifikovanej GC elektróde a PNR/GCE (**Obr. 3.21 A, C** vložené grafy, **Tab. 3.16**). Najnižšie hodnoty medze detekcie a stanoviteľnosti pre VMA boli opäť namerané na BDD elektróde, a naopak až 6-krát väčšie na Nafionom modifikovanej GC elektróde (**Tab. 3.16**).

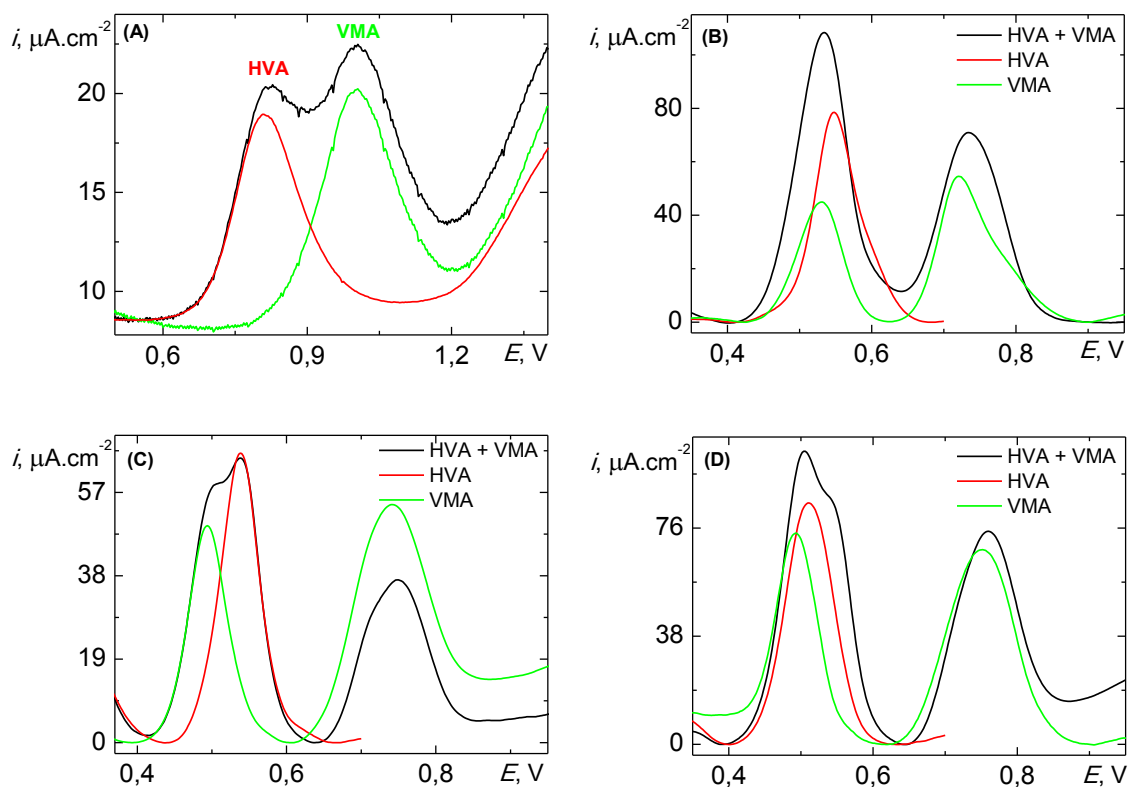
Tab. 3.16 Parametre kalibračných závislostí VMA zistené metódou DPV v prostredí 0,1 mol·l⁻¹ fosfátového pufru o pH 3,0 na rôznych elektródach, spoločne s určenými limitmi detekcie a kvantifikácie.

Elektróda	Rozsah (μmol·l ⁻¹)	Úsek (nA)	Smernica (nA·μmol ⁻¹ ·l)	R	LOD (μmol·l ⁻¹)	LOQ (μmol·l ⁻¹)
BDD ¹	2 – 100	-31,5 ± 6,2	7,2 ± 0,1	0,999	0,4	1,4
GCE	6 – 10	-20,6 ± 3,6	8,9 ± 0,4	0,998	1,5	5,0
	10 – 100	25,6 ± 9,2	3,8 ± 0,2	0,996		
Nafion/GCE	8 – 100	11,4 ± 5,3	3,9 ± 0,1	0,998	2,4	8,1
PNR/GCE	4 – 10	-15,4 ± 1,1	10,7 ± 0,2	1,000	1,1	3,5
	20 – 100	19,5 ± 3,9	4,3 ± 0,1	1,000		

Pri vzájomnom porovnávaní využívaných elektródových materiálov, BDD elektróda vykazuje niekoľko predností oproti ostatným. Medzi nich určite patrí pozorovaná linearita v celom rozsahu kalibračných závislostí v prípade oboch látok, čo súvisí s ich difúzne riadenou oxidáciou na tomto type elektródy. Taktiež hodnoty limitov detekcie a kvantifikácie pre HVA a VMA boli dosiahnuté nižšie na BDD elektróde v porovnaní s nemodifikovanými a modifikovanými elektródami na báze skleného uhlíku, čo má pravdepodobne súvis s lepším pomerom signálov k prúdom pozadia, čo je ďalšou z mnohých výhod BDD elektródy. Avšak je potrebné poznamenať, že všetky zistené hodnoty limitov kvantifikácie na daných elektródach sú postačujúce pre stanovenie oboch diagnostických markerov v moči.

3.7 Voltametrické stanovenie HVA a VMA v zmesi a vo vzorkách moču

Overenie možnosti súčasnej detekcie HVA a VMA (obe o $c = 0,1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) v zmesi v $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ fosfátovom pufrí o pH 3,0 bolo prevedené na všetkých skúmaných elektródových povrchoch a je zaznamenané na DP voltamogramoch (**Obr. 3.22**). Z nich jasne vyplýva, že odlíšiť pík HVA a prvý oxidačný pík VMA, ktorých potenciály sú si v prostredí o pH 3,0 značne blízke, sa na nemodifikovanej GC elektróde nepodarilo vôbec (**Obr. 3.22 B**), na Nafionom a PNR modifikovanej GC elektróde nachádzame len náznaky odlíšenia signálov jednotlivých kyselín (**Obr. 3.22 C, D**). V porovnaní s nimi je BDD elektróda v tomto prostredí schopná rozlíšiť odozvy HVA a VMA, avšak dochádza k ich čiastočnému prekrytiu¹ (**Obr. 3.22 A**).



Obr. 3.22 DP voltamogramy zmesi HVA a VMA (obe o $c = 0,1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) v prostredí $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ fosfátového pufru o pH 3,0 zmerané na (A) BDD elektróde¹, (B) nemodifikovanej GC elektróde, (C) Nafion/GCE a (d) PNR/GCE.

3.7.1 Extrakcie na tuhej fáze z moču

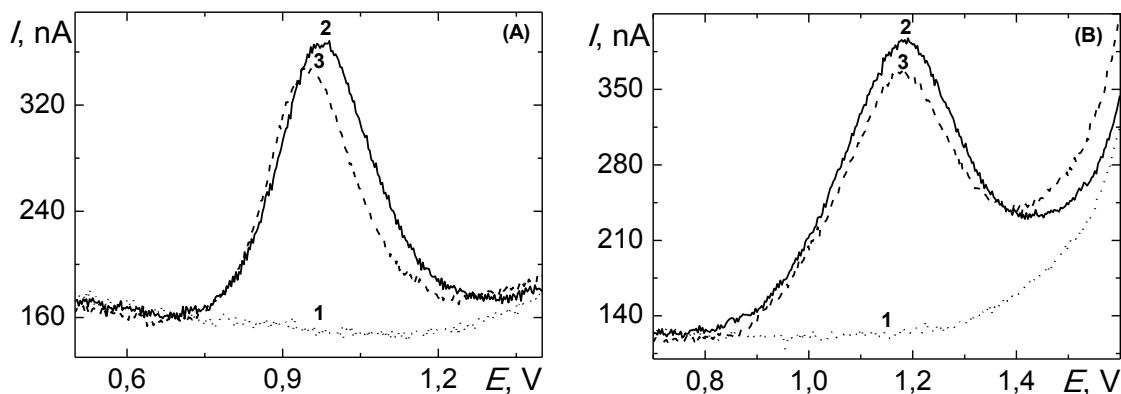
Anodicky aktivovaná BDD elektróda bola teda zvolená, na základe vyššie uvedených meraní, pre analýzy i v reálnych vzorkách moču DPV metódou. Pri priamej aplikácii na len $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ fosfátovým pufrom o pH 3,0 päťkrát zriedený moč, nebolo možné odlišiť signály skúmaných metabolitov, a táto metóda teda nepriniesla uspokojivé výsledky.

Preto bol optimalizovaný proces extrakcie na tuhej fáze, ktorý je detailne popísaný v Kap. 2.3.3, s použitím kolónky na báze kopolyméru styrénu a divinylbenzénu a silného anionového meniča pre HVA a VMA z deionizovanej vody, v ktorej bola dosiahnutá výťažnosť viac než 91 % pre obe látky (**Tab. 3.17**). Grafické znázornenie príslušných extrakcií HVA a VMA z deionizovanej vody vo forme DP voltamogramov je na obrázku (**Obr. 3.23**).

Ako elučné činidlo bol použitý niekoľkopercentný roztok HCOOH v metanole. Preto ešte pred samotným vykonaním optimalizácie a z dôvodu možného vyhnutia sa procesu odparovania po prevedení extrakcií, boli premerané DP voltamogramy HVA a VMA v zmiešanom prostredí 5 % (v/v) HCOOH v metanole – $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ fosfátový pufoer o pH 3,0 v pomere 2:3, ktoré sa potvrdilo ako bezproblémové pre stanovenie oboch kyselín.

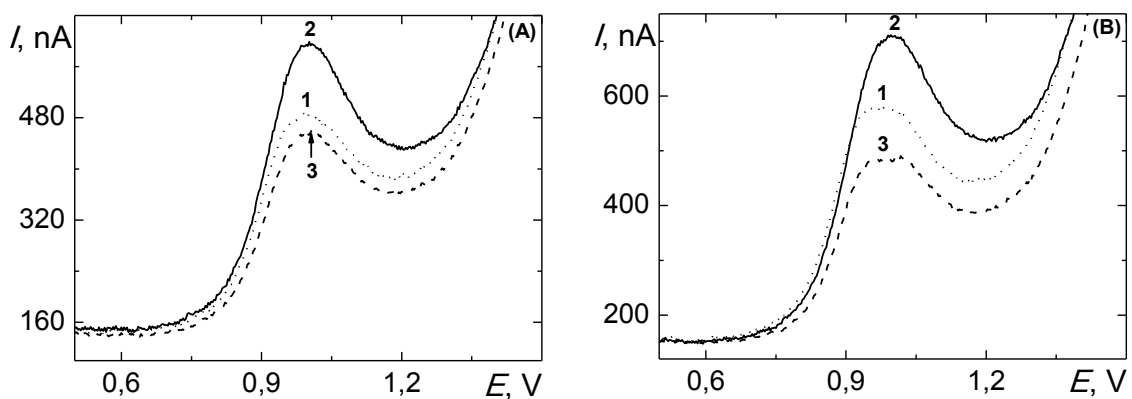
Tab. 3.17 Výťažky extrakcie HVA a VMA (obe o $c = 25 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$) z 15 ml deionizovanej vody a ich opakovateľnosť vyjadrená pomocou relatívnej smerodajnej odchýlky s_r (pre $n = 6$). Vyhodnotené metódou DPV s použitím anodicky aktivovanej BDD elektródy.

Analyt	Výťažok (%)						Výťažnosť (%)	s_r (%)
	1	2	3	4	5	6		
HVA	100,6	91,1	98,0	89,1	90,6	92,5	$91,8 \pm 4,6$	4,9
VMA	92,4	93,0	92,8	93,3	93,5	94,3	$93,2 \pm 0,8$	0,8



Obr. 3.23 DP voltamogramy (A) HVA a (B) VMA (obe o $c = 25 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) v prostredí 10 % (v/v) HCOOH v metanole – $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ fosfátový pufr o pH 3,0 (v pomere 2:3) po extrakcii tuhú fázou z 15 ml deionizovanej vody. Legenda: (1) slepá vzorka, (2) priamy prídavok (A) HVA a (B) VMA k slepej vzorke, (3) extrakt vodného roztoku.

Následne bol tento zoptimalizovaný postup extrakcie aplikovaný i na reálne vzorky moču, čo je graficky zdokumentované na príslušných grafoch (**Obr. 3.24**). V DP voltamograme slepej vzorky moču po extrakcii sa stále objavuje pík matrice v oblasti potenciálov, kde dochádza k oxidácii HVA a VMA. Avšak v porovnaní s neextrahovanou, len zriedenou vzorkou moču, došlo k významnému zníženiu výšky tohto pôvodne širokého píku, pochádzajúceho z biologickej matrice, o vyše 70 %. Po priamom prídavku HVA a VMA k slepej vzorke moču bol pozorovaný odpovedajúci nárast v nameranej voltametrickej odozve. Ale získané odozvy v extrahovanej spikovanej vzorke moču boli dokonca nižšie, v porovnaní so slepou vzorkou, a nepodarilo sa rozlíšiť signály jednotlivých skúmaných kyselín v tejto komplexnejšej matici.



Obr. 3.24 DP voltamogramy (A) HVA a (B) VMA (obe o $c = 25 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) v prostredí 10 % (v/v) HCOOH v metanole – $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ fosfátový pufr o pH 3,0 (v pomere 2:3) po extrakcii tuhrou fázou z 15 ml dvakrát nariedeného moču. Legenda: (1) slepá vzorka, (2) priamy prídavok (A) HVA a (B) VMA k slepej vzorke, (3) extrakt zo spikovaného moču.

4 ZÁVER

V rámci tejto práce prebehlo skúmanie elektroanalýzy produktov metabolizmu katecholamínov slúžiacich ako dôležité klinické markery, kyseliny vanilmandľovej a kyseliny homovanilovej, na GC elektróde, nemodifikovanej a modifikovanej mnohostenovými uhlíkovými nanotrubičkami, Nafionom a polymérom neutrálnej červene, a na BDD elektróde, aktivovanej anodickou polarizáciou a leštením na alumine.

K zabráneniu pasivácie elektródových povrchov medzi následnými scanmi a zabezpečeniu dostatočnej opakovateľnosti meraných signálov, bolo v prípade GC elektródy využívané leštenie na časticiach diamantového spreju a aluminy, u BDD elektródy elektrochemická anodická aktivácia *in-situ* ($E_{\text{akt}} = +2,4 \text{ V}$, 30 s) za súčasného miešania roztoku. Opakovateľnosť meraní na anodicky polarizovanej BDD elektróde je približne 3,3-krát väčšia oproti leštenej GC elektróde.

Prebehlo i bližšie preskúmanie vplyvu mechanickej aktivácie BDD elektródy, v podobe leštenia jej povrchu na časticiach aluminy, na voltametrickú odozvu HVA a VMA. Bolo potvrdené, že čím dlhšie trvajúce leštenie, tým lepšie dosiahnuté voltametrické odozvy, ktoré sa ale svojou výškou nevyrovnali tým, získaným na anodicky aktivovanej BDD elektróde, a to ani v kyslom, neutrálnom či báziickom prostredí. Leštenie BDD elektródy viedlo i k posunu potenciálov píkov oboch látok k pozitívnejším hodnotám.

Elektrochemické správanie HVA i VMA je výrazným spôsobom ovplyvnené nielen pH prostredím, v ktorom sa nachádzajú, ale i používaným elektródovým materiálom. Rozdiely v polohe i počte píkov boli odhalené v DP voltamogramoch príslušných kyselín nameraných na nemodifikovanej GC a BDD elektróde. Anodická oxidácia HVA a VMA prebiehala na GC elektróde pri výrazne nižších potenciáloch v porovnaní s BDD elektródou, prúdové hustoty píkov kyselín sú taktiež dosahované vyššie na GC elektróde, čo je spojené s väčšou hustotou elektroaktívnych miest na jej povrchu, avšak BDD elektróda sa vyznačuje i viac než 10-násobne nižšími prúdovými hustotami prúdov pozadia. Pre obe uhlíkové elektródy ale platí, že analytické signály HVA a VMA v kyslom prostredí o pH 2,0 a 3,0, kedy sa vyskytujú vo svojej neutrálnej forme, dosahujú najvyšších hodnôt, a je teda pre ich stanovenie najvhodnejšie. Prostredie $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$

fosfátového pufru o pH 3,0 bolo preto zvolené ako optimálne pre prevedenie ďalších experimentálnych meraní.

Boli pripravené a vyskúšané tri rôzne modifikácie GC elektródy. Prvá z nich, modifikácia mnohostenovými uhlíkovými nanotrubičkami, MWCNTs/GCE, sa však pre stanovenie týchto látok neosvedčila už pri predbežných meraniach, keďže poskytovala takmer 50-krát nižšie odozvy v porovnaní s nemodifikovanou GC elektródou. Ďalšie dve modifikácie pomocou ionoméru Nafionu a polyméru fenazínového farbiva neutrálnej červene, Nafion/GCE a PNR/GCE, sa použili k voltametrickému štúdiu HVA a VMA, i keď nepriniesli významné zlepšenie ich odozvy, jedine v prípade prvého píku VMA na PNR/GCE bol dosiahnutý jeho mierny nárast o niekoľko desiatok nA oproti nemodifikovanej GC elektróde.

Závislosť výšky prúdu píku HVA a VMA na rýchlosti polarizácie zostrojené na základe nameraných cyklických voltamogramov preukázali, že pri anodickej oxidácii HVA na nemodifikovanej GC elektróde, Nafion/GCE a PNR/GCE sa uplatňuje hlavne difúzia, rovnako ako aj u druhého oxidačného píku VMA, kdežto u prvého píku VMA sa ako hlavný riadiaci dej na všetkých troch elektródových materiáloch presadzuje adsorpcia. Oxidačný proces daných metabolitov je na BDD elektróde kontrolovaný difúziou.

Metódou DPV zistené hodnoty limitov kvantifikácie v rámci práce sú v prípade HVA aj VMA na všetkých použitých elektródach postačujúce pre ich klinickú analýzu v moči. Najnižšie hodnoty boli dosiahnuté u oboch látok na anodicky aktivovanej BDD elektróde, na ktorej bola pozorovaná linearita v celom koncentračnom rozsahu 2 až 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

V nasledujúcich dvoch tabuľkách je uvedený prehľad elektroanalytických, prevažne voltametrických metód vyvinutých pre stanovenie HVA (**Tab. 4.1**) a VMA (**Tab. 4.2**), spoločne s použitou pracovnou elektródou na báze uhlíku, prostredím, potenciálom píku a hodnotami limitov detekcie. Z nich jasne vyplýva, že potenciály píkov oboch študovaných látok dosahujú najvyššie hodnoty na BDD elektróde, v prostredí o podobnom pH v porovnaní s inými elektródami na báze uhlíku. Veľkými výhodami BDD elektródy sú však jednoznačne žiadna nutnosť modifikácie povrchu a možnosť elektrochemickej aktivácie *in-situ*. Dosiahnuté hodnoty medze detekcie na tejto elektróde sú porovnateľné s mnohými inými použitými uhlíkovými materiálmi.

Z dôvodu blízkych hodnôt potenciálov píkuv HVA a VMA na nemodifikovanej GC elektróde i na Nafion/GCE a PNR/GCE sa nepodarilo odlíšiť jednotlivé odozvy kyselín, čiastočné rozlíšenie ich signálov bolo dosiahnuté pri použití anodicky aktivovanej BDD elektródy.

Z vyššie uvedeného súhrnu zistení vyplýva, že najlepšie výsledky pri stanovení HVA a VMA poskytla práve anodicky aktivovaná BDD elektróda, ktorá bola zvolená pre aplikáciu na reálne vzorky moču, a to priamo i po predchádzajúcej extrakcii na tuhej fáze, ktorej postup bol zoptimalizovaný. Ani jeden z týchto prístupov ale nevedol k metóde umožňujúcej spoľahlivé stanovenie oboch analytov v tejto komplexnejšej biologickej matrici.

Ďalší výskum analýzy týchto metabolitov v biologických vzorkách by mal preto smerovať predovšetkým k obmedzeniu vplyvu matrice, čo je možné dosiahnuť napríklad voľbou iného typu extrakčných kolóniek či separáciou v chromatografických systémoch. I v týchto aplikáciách sa dá predpokladať využitie BDD elektródy, ktorú je možné jednoduchým spôsobom anodicky aktivovať *in-situ*, a tým zabezpečiť odolnosť voči pasivácii a dobrú opakovateľnosť nameraných signálov, a ktorá nevyžaduje zdĺhavé procesy prípravy v porovnaní s modifikovanými elektródami a oplýva dostatočnou citlivosťou.

Tab. 4. 1 Prehľad elektroanalytických metód vyvinutých pre stanovenie HVA, spolu s použitým typom uhlíkovej pracovnej elektródy, prostredím, potenciálom píku E_p a limitom detekcie.

Modifikácia / pracovná elektróda	Referenčná elektróda	Prostredie	Metóda	E_p (mV)	LOD ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	Cit.
BDD elektróda	Ag/AgCl	0,1 mol·l ⁻¹ fosfátový pufo r o pH 3,0	DCV	+908	1,0	¹
			DPV	+835	0,6	¹
GC elektróda	Ag/AgCl	0,1 mol·l ⁻¹ fosfátový pufo r o pH 3,0	DPV	+542	0,9	^a
Nafion/GCE	Ag/AgCl	0,1 mol·l ⁻¹ fosfátový pufo r o pH 3,0	DPV	+540	0,8	^a
PNR/GCE	Ag/AgCl	0,1 mol·l ⁻¹ fosfátový pufo r o pH 3,0	DPV	+540	1,2	^a
poly(3-amino-5-merkapt o-1,2,4-triazol)/GCE	Ag/AgCl	0,2 mol·l ⁻¹ fosfátový pufo r o pH 7,2	ChA	+420	$9,4\cdot 10^{-5}$	²¹
poly(alíz arínová červe ň S)/GCE	Ag/AgCl	0,1 mol·l ⁻¹ fosfátový pufo r o pH 3,0	DPV	+662	$1,7\cdot 10^{-2}$	²⁰
Cu/GCE	SCE	0,1 mol·l ⁻¹ fosfátový pufo r o pH 7,2	SWV	+590	$1,0\cdot 10^{-2}$	¹⁹
molekulárne vtlač ený polymér/GCE	Ag/AgCl	0,1 mol·l ⁻¹ kyselina citrónová/HCl o pH 1,1 s 40 % acetonitrilom	DPV	+810	$7,0\cdot 10^{-3}$	¹⁵
kompozitná uhlíková filmová elektróda	Ag/AgCl	BR pufo r o pH 2,0	DPV	+700	0,1	¹⁶
uhlíková pastová elektróda	Ag/AgCl	BR pufo r o pH 2,0	DPV	+720	0,4	¹⁸
fosfatidyletanolamín/uhlíková pastová elektróda	SCE	fosfátový pufo r o pH 7,4	CV	+550	3,0	²²
sieťotlač ová uhlíková elektróda	Ag/AgCl	BR pufo r o pH 3,0	DPV	+380	0,2	¹⁷

^a táto práca

Použíte skratky: SCE = nasýtená kalomelová elektróda, DCV = „direct-current“ voltametria, ChA = hydrodynamická chronoampérometria, SWV = „square-wave“ volametria.

Tab. 4.2 Prehľad elektroanalytických metód vyvinutých pre stanovenie VMA, spolu s použitým typom uhlíkovej pracovnej elektródy, prostredím, potenciálom pík E_p a limitom detekcie. Všetky údaje sú uvedené pre prvý oxidačný pík.

Modifikácia / pracovná elektróda	Prostredie	Metóda	E_p^a (mV)	LOD ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	Cit.
BDD elektróda	0,1 mol·l ⁻¹ fosfátový pufo r o pH 3,0	DCV	+1085	0,7	¹
		DPV	+1005	0,4	¹
GC elektróda	0,1 mol·l ⁻¹ fosfátový pufo r o pH 3,0	DPV	+504	1,5	^b
Nafion/GCE	0,1 mol·l ⁻¹ fosfátový pufo r o pH 3,0	DPV	+494	2,4	^b
PNR/GCE	0,1 mol·l ⁻¹ fosfátový pufo r o pH 3,0	DPV	+494	1,1	^b
molekulárne vtlačený polymér/GCE	0,025 mol·l ⁻¹ citrátový pufo r o pH 3,0 s 10 % acetonitrilom	DPV	+845	^c	²³
uhlíková kompozitná filmová elektróda	BR pufo r o pH 2,0	DPV	+680	0,2	¹⁶
uhlíková pastová elektróda	BR pufo r o pH 2,0	DPV	+720	0,6	¹⁸
sieťotlačová uhlíková elektróda	BR pufo r o pH 3,0	DPV	+370	0,1	¹⁷
MWCNTs/sieťotlačová elektróda	1 mmol·l ⁻¹ fosfátový pufo r o pH 6,85	DPV	+380	1,0	¹⁴
„edge-plane“ pyrolitická grafitová elektróda	1 mmol·l ⁻¹ fosfátový pufo r o pH 6,85	DPV	+430	1,7	¹⁴

^a potenciál vzťahnutý k referenčnej Ag/AgCl elektróde, pokiaľ nie je uvedené inak

^b táto práca

^c hodnota neuvedená

Použité skratky: DCV = „direct-current“ voltametria.

5 LITERATÚRA

1. Baluchová, S., Voltametrické stanovenie klinických markerov kyseliny vanilmandľovej a homovanilovej na bórom dopovanej diamantovej elektróde. Univerzita Karlova, Praha, 2015.
2. Matsuo, M.; Tasaki, R.; Kodama, H.; Hamasaki, Y., Screening for Menkes disease using the urine HVA/VMA ratio. *J. Inherit. Metab. Dis.* **2005**, *28*, 89-93.
3. Barco, S.; Gennai, I.; Reggiardo, G.; Galleni, B.; Barbagallo, L.; Maffia, A.; Viscardi, E.; De Leonardis, F.; Cecinati, V.; Sorrentino, S.; Garaventa, A.; Conte, M.; Cangemi, G., Urinary homovanillic and vanillylmandelic acid in the diagnosis of neuroblastoma: Report from the Italian Cooperative Group for Neuroblastoma. *Clin. Biochem.* **2014**, *47*, 848-852.
4. Lenders, J. W. M.; Pacak, K.; Walther, M. M.; Linehan, W. M.; Mannelli, M.; Friberg, P.; Keiser, H. R.; Goldstein, D. S.; Eisenhofer, G., Biochemical diagnosis of pheochromocytoma - Which test is best? *JAMA-J. Am. Med. Assoc.* **2002**, *287*, 1427-1434.
5. Eisenhofer, G.; Kopin, I. J.; Goldstein, D. S., Catecholamine metabolism: A contemporary view with implications for physiology and medicine. *Pharmacol. Rev.* **2004**, *56*, 331-349.
6. Monsaingeon, M.; Perel, Y.; Simonnet, G.; Corcuff, J. B., Comparative values of catecholamines and metabolites for the diagnosis of neuroblastoma. *Eur. J. Pediatr.* **2003**, *162*, 397-402.
7. Maris, J. M.; Hogarty, M. D.; Bagatell, R.; Cohn, S. L., Neuroblastoma. *Lancet* **2007**, *369*, 2106-2120.
8. Rosano, T. G.; Swift, T. A.; Hayes, L. W., Advances in catecholamine and metabolite measurements for diagnosis of pheochromocytoma. *Clin. Chem.* **1991**, *37*, 1854-1867.
9. Unceta, N.; Rodriguez, E.; de Balugera, Z. G.; Sampedro, C.; Goicolea, M. A.; Barrondo, S.; Salles, J.; Barrio, R. J., Determination of catecholamines and their metabolites in human plasma using liquid chromatography with coulometric multi-electrode cell-design detection. *Anal. Chim. Acta* **2001**, *444*, 211-221.

10. Siren, H.; Mielonen, M.; Herlevi, M., Capillary electrophoresis in the determination of anionic catecholamine metabolites from patients' urine. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1032*, 289-297.
11. Flottmann, D.; Hins, J.; Rettenmaier, C.; Schnell, N.; Kuci, Z.; Merkel, G.; Seitz, G.; Bruchelt, G., Two-dimensional isotachopheresis for the analysis of homovanillic acid and vanillylmandelic acid in urine for cancer therapy monitoring. *Microchim. Acta* **2006**, *154*, 49-53.
12. Konieczna, L.; Roszkowska, A.; Niedzwiecki, M.; Baczek, T., Hydrophilic interaction chromatography combined with dispersive liquid-liquid microextraction as a preconcentration tool for the simultaneous determination of the panel of underivatized neurotransmitters in human urine samples. *J. Chromatogr. A* **2016**, *1431*, 111-121.
13. Shishkanova, T. V.; Havlik, M.; Dendisova, M.; Matejka, P.; Kral, V., Synthesis and deposition of a Troger's base polymer on the electrode surface for potentiometric detection of a neuroblastoma tumor marker metabolite. *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 11991-11994.
14. Li, Q. A.; Batchelor-McAuley, C.; Compton, R. G., Electrooxidative decarboxylation of vanillylmandelic acid: Voltammetric differentiation between the structurally related compounds homovanillic acid and vanillylmandelic acid. *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 9713-9719.
15. Dineiro, Y.; Menendez, M. I.; Blanco-Lopez, M. C.; Lobo-Castanon, M. J.; Miranda-Ordieres, A. J.; Tunon-Blanco, P., Computational approach to the rational design of molecularly imprinted polymers for voltammetric sensing of homovanillic acid. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 6741-6746.
16. Libansky, M.; Zima, J.; Barek, J.; Dejmekova, H., Voltammetric determination of homovanillic acid and vanillylmandelic acid on a disposable electrochemical measuring cell system with integrated carbon composite film electrodes. *Monatsh Chem* **2015**, 1-8.
17. Makrlíková, A.; Ktena, E.; Economou, A.; Fischer, J.; Navrátil, T.; Barek, J.; Vyskočil, V., Voltammetric determination of tumor biomarkers for neuroblastoma (homovanillic acid, vanillylmandelic acid, and 5-hydroxyindole-3-acetic acid) at screen-printed carbon electrodes. *Electroanalysis* **2017**, *29*, 146-153.

18. Dejmekova, H.; Adamkova, H.; Barek, J.; Zima, J., Voltammetric and amperometric determination of selected catecholamine metabolites using glassy carbon paste electrode. *Mon. Chem.* **2017**, *148*, 511-515.
19. Selvaraju, T.; Ramaraj, R., Simultaneous detection of ascorbic acid, uric acid and homovanillic acid at copper modified electrode. *Electrochim. Acta* **2007**, *52*, 2998-3005.
20. Hatefi-Mehrjardi, A.; Ghaemi, N.; Karimi, M. A.; Ghasemi, M.; Islami-Ramchahi, S., Poly-(alizarin red S)-modified glassy carbon electrode for simultaneous electrochemical determination of levodopa, homovanillic acid and ascorbic acid. *Electroanalysis* **2014**, *26*, 2491-2500.
21. Revin, S. B.; John, S. A., Simultaneous determination of two important dopamine metabolites at physiological pH by voltammetry. *Anal. Methods* **2012**, *4*, 348-352.
22. Al Mulla, I.; Lowry, J. P.; Serra, P. A.; O'Neill, R. D., Development of a voltammetric technique for monitoring brain dopamine metabolism: compensation for interference caused by DOPAC electrogenerated during homovanillic acid detection. *Analyst* **2009**, *134*, 893-898.
23. Blanco-Lopez, M. C.; Lobo-Castanon, M. J.; Miranda-Ordieres, A. J.; Tunon-Blanco, P., Voltammetric sensor for vanillylmandelic acid based on molecularly imprinted polymer-modified electrodes. *Biosens. Bioelectron.* **2003**, *18*, 353-362.
24. Petek, M.; Bruckenstein, S.; Feinberg, B.; Adams, R. N., Anodic oxidation of substituted methoxyphenols. Mass spectrometric identification of methanol formed. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry* **1973**, *42*, 397-401.
25. Blanco-Lopez, M. C.; Lobo-Castanon, M. J.; Ordieres, A. J. M.; Tunon-Blanco, P., Electrochemical behavior of catecholamines and related compounds at in situ surfactant modified carbon paste electrodes. *Electroanalysis* **2007**, *19*, 207-213.
26. McCreery, R. L., Advanced carbon electrode materials for molecular electrochemistry. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2646-2687.
27. Uslu, B.; Ozkan, S. A., Electroanalytical application of carbon based electrodes to the pharmaceuticals. *Anal. Lett.* **2007**, *40*, 817-853.
28. Kraft, A., Doped diamond: A compact review on a new, versatile electrode material. *Int. J. Electrochem. Sci.* **2007**, *2*, 355-385.

29. Actis, P.; Denoyelle, A.; Boukherroub, R.; Szunerits, S., Influence of the surface termination on the electrochemical properties of boron-doped diamond (BDD) interfaces. *Electrochem. Commun.* **2008**, *10*, 402-406.
30. Szunerits, S.; Boukherroub, R., Different strategies for functionalization of diamond surfaces. *J. Solid State Electrochem.* **2008**, *12*, 1205-1218.
31. Girard, H. A.; Simon, N.; Ballutaud, D.; de La Rochefoucauld, E.; Etcheberry, A., Effects of controlled anodic treatments on electrochemical behaviour of boron doped diamond. *Diam. Relat. Mat.* **2007**, *16*, 888-891.
32. Macpherson, J. V., A practical guide to using boron doped diamond in electrochemical research. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2015**, *17*, 2935-2949.
33. Granger, M. C.; Witek, M.; Xu, J. S.; Wang, J.; Hupert, M.; Hanks, A.; Koppang, M. D.; Butler, J. E.; Lucazeau, G.; Mermoux, M.; Strojek, J. W.; Swain, G. M., Standard electrochemical behavior of high-quality, boron-doped polycrystalline diamond thin-film electrodes. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 3793-3804.
34. Ryl, J.; Burczyk, L.; Bogdanowicz, R.; Sobaszek, M.; Darowicki, K., Study on surface termination of boron-doped diamond electrodes under anodic polarization in H₂SO₄ by means of dynamic impedance technique. *Carbon* **2016**, *96*, 1093-1105.
35. Liu, F. B.; Wang, J. D.; Liu, B.; Li, X. M.; Chen, D. R., Effect of electronic structures on electrochemical behaviors of surface-terminated boron-doped diamond film electrodes. *Diam. Relat. Mat.* **2007**, *16*, 454-460.
36. Hutton, L. A.; Iacobini, J. G.; Bitziou, E.; Channon, R. B.; Newton, M. E.; Macpherson, J. V., Examination of the factors affecting the electrochemical performance of oxygen-terminated polycrystalline boron-doped diamond electrodes. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 7230-7240.
37. Chaplin, B. P.; Hubler, D. K.; Farrell, J., Understanding anodic wear at boron doped diamond film electrodes. *Electrochim. Acta* **2013**, *89*, 122-131.
38. Duo, I.; Levy-Clement, C.; Fujishima, A.; Comninellis, C., Electron transfer kinetics on boron-doped diamond Part I: Influence of anodic treatment. *J. Appl. Electrochem.* **2004**, *34*, 935-943.
39. Narmadha, M.; Noel, M.; Suryanarayanan, V., Relative deactivation of boron-doped diamond (BDD) and glassy carbon (GC) electrodes in different electrolyte media

- containing substituted phenols - Voltammetric and surface morphologic studies. *J. Electroanal. Chem.* **2011**, 655, 103-110.
40. Pedrosa, V. A.; Suffredini, H. B.; Codognoto, L.; Tanimoto, S. T.; Machado, S. A. S.; Avaca, L. A., Carbon surfaces for electroanalytical applications: A comparative study. *Anal. Lett.* **2005**, 38, 1115-1125.
41. Brycht, M.; Lochynski, P.; Barek, J.; Skrzypek, S.; Kuczewski, K.; Schwarzova-Peckova, K., Electrochemical study of 4-chloro-3-methylphenol on anodically pretreated boron-doped diamond electrode in the absence and presence of a cationic surfactant. *J. Electroanal. Chem.* **2016**, 771, 1-9.
42. Yardim, Y.; Keskin, E.; Senturk, Z., Voltammetric determination of mixtures of caffeine and chlorogenic acid in beverage samples using a boron-doped diamond electrode. *Talanta* **2013**, 116, 1010-1017.
43. Lei, Y. Z.; Zhao, G. H.; Liu, M. C.; Xiao, X.; Tang, Y. T.; Li, D. M., Simple and feasible simultaneous determination of three phenolic pollutants on boron-doped diamond film electrode. *Electroanalysis* **2007**, 19, 1933-1938.
44. Nasr, B.; Hsen, T.; Abdellatif, G., Electrochemical treatment of aqueous wastes containing pyrogallol by BDD-anodic oxidation. *J. Environ. Manage.* **2009**, 90, 523-530.
45. Yardim, Y.; Gulcan, M.; Senturk, Z., Determination of vanillin in commercial food product by adsorptive stripping voltammetry using a boron-doped diamond electrode. *Food Chem.* **2013**, 141, 1821-1827.
46. Panizza, M.; Michaud, P. A.; Cerisola, G.; Comninellis, C., Anodic oxidation of 2-naphthol at boron-doped diamond electrodes. *J. Electroanal. Chem.* **2001**, 507, 206-214.
47. Iniesta, J.; Michaud, P. A.; Panizza, M.; Cerisola, G.; Aldaz, A.; Comninellis, C., Electrochemical oxidation of phenol at boron-doped diamond electrode. *Electrochim. Acta* **2001**, 46, 3573-3578.
48. Brocenschi, R. F.; Hammer, P.; Deslouis, C.; Rocha, R. C., Assessments of the effect of increasingly severe cathodic pretreatments on the electrochemical activity of polycrystalline boron-doped diamond electrodes. *Anal. Chem.* **2016**, 88, 5363-5368.
49. Salazar-Banda, G. R.; Andrade, L. S.; Nascente, P. A. P.; Pizani, P. S.; Rocha, R. C.; Avaca, L. A., On the changing electrochemical behaviour of boron-doped diamond surfaces with time after cathodic pre-treatments. *Electrochim. Acta* **2006**, 51, 4612-4619.

50. Hoffmann, R.; Kriele, A.; Obloh, H.; Hees, J.; Wolfer, M.; Smirnov, W.; Yang, N.; Nebel, C. E., Electrochemical hydrogen termination of boron-doped diamond. *Appl. Phys. Lett.* **2010**, *97*.
51. Salazar-Banda, G. R.; de Carvalho, A. E.; Andrade, L. S.; Rocha, R. C.; Avaca, L. A., On the activation and physical degradation of boron-doped diamond surfaces brought on by cathodic pretreatments. *J. Appl. Electrochem.* **2010**, *40*, 1817-1827.
52. Brocenschi, R. F.; Rocha, R. C.; Biaggio, S. R.; Bocchi, N., DPV and SWV determination of estrone using a cathodically pretreated boron-doped diamond electrode. *Electroanalysis* **2014**, *26*, 1588-1597.
53. Medeiros, R. A.; Rocha, R. C.; Fatibello, O., Simultaneous voltammetric determination of phenolic antioxidants in food using a boron-doped diamond electrode. *Food Chem.* **2010**, *123*, 886-891.
54. Pereira, G. F.; Andrade, L. S.; Rocha, R. C.; Bocchi, N.; Biaggio, S. R., Electrochemical determination of bisphenol A using a boron-doped diamond electrode. *Electrochim. Acta* **2012**, *82*, 3-8.
55. Mielech-Lukasiewicz, K.; Dabrowska, A., Comparison of boron-doped diamond and glassy carbon electrodes for determination of terbinafine in pharmaceuticals using differential pulse and square wave voltammetry. *Anal. Lett.* **2014**, *47*, 1697-1711.
56. Yardim, Y., Sensitive detection of capsaicin by adsorptive stripping voltammetry at a boron-doped diamond electrode in the presence of sodium dodecylsulfate. *Electroanalysis* **2011**, *23*, 2491-2497.
57. Pinar, P. T.; Yardim, Y.; Senturk, Z., Voltammetric behavior of rutin at a boron-doped diamond electrode. Its electroanalytical determination in a pharmaceutical formulation. *Cent. Eur. J. Chem* **2013**, *11*, 1674-1681.
58. Gumustas, M.; Ozkan, S. A., Electrochemical evaluation and determination of antiretroviral drug fosamprenavir using boron-doped diamond and glassy carbon electrodes. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *397*, 189-203.
59. Uslu, B.; Topal, B. D.; Ozkan, S. A., Electroanalytical investigation and determination of pefloxacin in pharmaceuticals and serum at boron-doped diamond and glassy carbon electrodes. *Talanta* **2008**, *74*, 1191-1200.

60. Kul, D.; Gumustas, M.; Uslu, B.; Ozkan, S. A., Electroanalytical characteristics of antipsychotic drug ziprasidone and its determination in pharmaceuticals and serum samples on solid electrodes. *Talanta* **2010**, *82*, 286-295.
61. Zavazalova, J.; Prochazkova, K.; Schwarzova-Peckova, K., Boron-doped diamond electrodes for voltammetric determination of benzophenone-3. *Anal. Lett.* **2016**, *49*, 80-91.
62. Wei, M.; Zhou, Y. L.; Zhi, J. F.; Fu, D. G.; Einaga, Y.; Fujishima, A.; Wang, X. M.; Gu, Z. Z., Comparison of boron-doped electrodes for determination diamond and glassy carbon of procaine hydrochloride. *Electroanalysis* **2008**, *20*, 137-143.
63. Suryanarayanan, V.; Noel, M., A comparative evaluation on the voltammetric behavior of boron-doped diamond (BDD) and glassy carbon (GC) electrodes in different electrolyte media. *J. Electroanal. Chem.* **2010**, *642*, 69-74.
64. Iijima, S., Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature* **1991**, *354*, 56-58.
65. Qi, H. L.; Zhang, C. X., Simultaneous determination of hydroquinone and catechol at a glassy carbon electrode modified with multiwall carbon nanotubes. *Electroanalysis* **2005**, *17*, 832-838.
66. Saeed, K.; Ibrahim, Carbon nanotubes-properties and applications: a review. *Carbon Lett.* **2013**, *14*, 131-144.
67. Cittan, M.; Kocak, S.; Celik, A.; Dost, K., Determination of oleuropein using multiwalled carbon nanotube modified glassy carbon electrode by adsorptive stripping square wave voltammetry. *Talanta* **2016**, *159*, 148-154.
68. Lu, X. M.; Wu, Z. W.; Shen, J. Y.; Feng, J.; Wang, Y. T.; Song, Y. Z., Electrochemical behavior of 2, 4-dinitrophenol at multi-walled carbon nanotube-modified glassy carbon electrode and its application. *Int. J. Electrochem. Sci.* **2013**, *8*, 2229-2237.
69. Barsan, M. M.; Ghica, M. E.; Brett, C. M. A., Electrochemical sensors and biosensors based on redox polymer/carbon nanotube modified electrodes: A review. *Anal. Chim. Acta* **2015**, *881*, 1-23.
70. Ding, Y. P.; Liu, W. L.; Wu, Q. S.; Wang, X. G., Direct simultaneous determination of dihydroxybenzene isomers at C-nanotube-modified electrodes by derivative voltammetry. *J. Electroanal. Chem.* **2005**, *575*, 275-280.

71. Cardoso, R. M.; Montes, R. H. O.; Lima, A. P.; Dornellas, R. M.; Nossol, E.; Richter, E. M.; Munoz, R. A. A., Multi-walled carbon nanotubes: Size-dependent electrochemistry of phenolic compounds. *Electrochim. Acta* **2015**, *176*, 36-43.
72. Zhu, Y.; Zhang, Z.; Zhao, W.; Pang, D., Voltammetric behavior and determination of phenylephrine at a glassy carbon electrode modified with multi-wall carbon nanotubes. *Sens. Actuator B-Chem.* **2006**, *119*, 308-314.
73. Wang, J.; Deo, R. P.; Musameh, M., Stable and sensitive electrochemical detection of phenolic compounds at carbon nanotube modified glassy carbon electrodes. *Electroanalysis* **2003**, *15*, 1830-1834.
74. Ziyatdinova, G. K.; Nizamova, A. M.; Aytuganova, II; Budnikov, H. C., Voltammetric evaluation of the antioxidant capacity of tea on electrodes modified with multi-walled carbon nanotubes. *J. Anal. Chem.* **2013**, *68*, 132-139.
75. Mauritz, K. A.; Moore, R. B., State of understanding of Nafion. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 4535-4585.
76. HeitnerWirguin, C., Recent advances in perfluorinated ionomer membranes: Structure, properties and applications. *J. Membr. Sci.* **1996**, *120*, 1-33.
77. Ghorbani-Bidkorbeh, F.; Shahrokhian, S.; Mohammadi, A.; Dinarvand, R., Electrochemical determination of naltrexone on the surface of glassy carbon electrode modified with Nafion-doped carbon nanoparticles: Application to determinations in pharmaceutical and clinical preparations. *J. Electroanal. Chem.* **2010**, *638*, 212-217.
78. Yi, H. C.; Wu, K. B.; Hu, S. S.; Cui, D. F., Adsorption stripping voltammetry of phenol at Nafion-modified glassy carbon electrode in the presence of surfactants. *Talanta* **2001**, *55*, 1205-1210.
79. Tsai, Y. C.; Chen, J. M.; Li, S. C.; Marken, F., Electro analytical thin film electrodes based on a Nafion (TM) - multi-walled carbon nanotube composite. *Electrochem. Commun.* **2004**, *6*, 917-922.
80. Desimoni, E.; Brunetti, B., Glassy carbon electrodes film-modified with acidic functionalities. A review. *Electroanalysis* **2012**, *24*, 1481-1500.
81. Huang, W. S.; Yang, C. H.; Zhang, S. H., Simultaneous determination of 2-nitrophenol and 4-nitrophenol based on the multi-wall carbon nanotubes nafion-modified electrode. *Anal. Bioanal. Chem.* **2003**, *375*, 703-707.

82. Zavazalova, J.; Ghica, M. E.; Schwarzova-Peckova, K.; Barek, J.; Brett, C. M. A., Carbon-based electrodes for sensitive electroanalytical determination of aminonaphthalenes. *Electroanalysis* **2015**, *27*, 1556-1564.
83. Hu, S. S.; Wu, K. B.; Yi, H. C.; Cui, D. F., Voltammetric behavior and determination of estrogens at Nafion-modified glassy carbon electrode in the presence of cetyltrimethylammonium bromide. *Anal. Chim. Acta* **2002**, *464*, 209-216.
84. Wu, K. B.; Hu, S. S., Electrochemical study and selective determination of dopamine at a multi-wall carbon nanotube-Nafion film coated glassy carbon electrode. *Microchim. Acta* **2004**, *144*, 131-137.
85. Pauliukaite, R.; Brett, C. M. A., Poly(neutral red): Electrosynthesis, characterization, and application as a redox mediator. *Electroanalysis* **2008**, *20*, 1275-1285.
86. Dilgin, D. G.; Gligor, D.; Gokcel, H. I.; Dursun, Z.; Dilgin, Y., Glassy carbon electrode modified with poly-Neutral Red for photoelectrocatalytic oxidation of NADH. *Microchim. Acta* **2011**, *173*, 469-476.
87. Pauliukaite, R.; Ghica, M. E.; Barsan, M. M.; Brett, C. M. A., Phenazines and polyphenazines in electrochemical sensors and biosensors. *Anal. Lett.* **2010**, *43*, 1588-1608.
88. Schlereth, D. D.; Karyakin, A. A., Electropolymerization of phenothiazine, phenoxazine and phenazine derivatives: characterization of the polymers by UV-visible difference spectroelectrochemistry and Fourier transform IR spectroscopy. *J. Electroanal. Chem.* **1995**, *395*, 221-232.
89. Sun, Y. X.; Ye, B. X.; Zhang, W. M.; Zhou, X. Y., Simultaneous determination of dopamine and ascorbic acid at poly(neutral red) modified electrodes. *Anal. Chim. Acta* **1998**, *363*, 75-80.
90. Musilova, J.; Barek, J.; Peckova, K., Determination of nitrophenols in drinking and river water by differential pulse voltammetry at boron-doped diamond film electrode. *Electroanalysis* **2011**, *23*, 1236-1244.
91. Enache, T. A.; Oliveira-Brett, A. M., Phenol and para-substituted phenols electrochemical oxidation pathways. *J. Electroanal. Chem.* **2011**, *655*, 9-16.

92. Berrios, C.; Arce, R.; Rezende, M. C.; Ureta-Zanartu, M. S.; Gutierrez, C., Electrooxidation of chlorophenols at a glassy carbon electrode in a pH 11 buffer. *Electrochim. Acta* **2008**, *53*, 2768-2775.
93. Sun, L. J.; Chen, J.; Zhao, F. M.; Liu, N.; Zhang, Y. Q.; Jia, J. B.; Wang, J. G., Direct determination of trace dopamine in an ascorbic acid solution at a bare glassy carbon electrode using differential pulse voltammetry. *Electroanalysis* **2015**, *27*, 1411-1415.
94. Gil, E. D.; Enache, A. T.; de Oliveira-Brett, A. M., Anodic behaviour of flavonoids orientin, eriodictyol and robinin at a glassy carbon electrode. *Electroanalysis* **2012**, *24*, 1576-1583.
95. Ahammad, A. J. S.; Sarker, S.; Rahman, M. A.; Lee, J. J., Simultaneous determination of hydroquinone and catechol at an activated glassy carbon electrode. *Electroanalysis* **2010**, *22*, 694-700.
96. Ghalkhani, M.; Fernandes, I. P. G.; Oliveira, S. C. B.; Shahrokhian, S.; Oliveira-Brett, A. M., Anodic behavior of clioquinol at a glassy carbon electrode. *Bioelectrochemistry* **2011**, *80*, 175-181.
97. Brett, A. M. O.; Ghica, M. E., Electrochemical oxidation of quercetin. *Electroanalysis* **2003**, *15*, 1745-1750.
98. da Silva, L. F.; Stradiotto, N. R.; Oliveira, H. P., Determination of caffeic acid in red wine by voltammetric method. *Electroanalysis* **2008**, *20*, 1252-1258.
99. Janeiro, P.; Novak, I.; Seruga, M.; Oliveira-Brett, A. M., Electroanalytical oxidation of p-coumaric acid. *Anal. Lett.* **2007**, *40*, 3309-3321.
100. Jorge, S. M. A.; Pontinha, A. D. R.; Marques, M. P. M.; Oliveira-Brett, A. M., Solid state electrochemical behavior of usnic acid at a glassy carbon electrode. *Anal. Lett.* **2010**, *43*, 1713-1722.
101. Brett, A. M. O.; Macedo, T. R. A.; Raimundo, D.; Marques, M. H.; Serrano, S. H. P., Electrochemical oxidation of mitoxantrone at a glassy carbon electrode. *Anal. Chim. Acta* **1999**, *385*, 401-408.
102. Janeiro, P.; Brett, A. M. O., Solid state electrochemical oxidation mechanisms of morin in aqueous media. *Electroanalysis* **2005**, *17*, 733-738.

103. Pontie, M.; Thouand, G.; De Nardi, F.; Tapsoba, I.; Lherbette, S., Antipassivating electrochemical process of glassy carbon electrode (GCE) dedicated to the oxidation of nitrophenol compounds. *Electroanalysis* **2011**, *23*, 1579-1584.
104. Oliveira, S. C. B.; Diculescu, V. C.; Palleschi, G.; Compagnone, D.; Oliveira-Brett, A. M., Electrochemical oxidation of ochratoxin A at a glassy carbon electrode and in situ evaluation of the interaction with deoxyribonucleic acid using an electrochemical deoxyribonucleic acid-biosensor. *Anal. Chim. Acta* **2007**, *588*, 283-291.
105. Corduneanu, O.; Janeiro, P.; Brett, A. M. O., On the electrochemical oxidation of resveratrol. *Electroanalysis* **2006**, *18*, 757-762.
106. Ghica, M. E.; Brett, A. M. O., Electrochemical oxidation of rutin. *Electroanalysis* **2005**, *17*, 313-318.
107. Carvalho, R. C.; Gouveia-Caridade, C.; Brett, C. M. A., Glassy carbon electrodes modified by multiwalled carbon nanotubes and poly(neutral red): A comparative study of different brands and application to electrocatalytic ascorbate determination. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *398*, 1675-1685.
108. Macherey-Nagel. Dostupné z <http://www.mn-net.com/tabid/11013/default.aspx>, stiahnuté 1. 6. 2016.
109. Eckschlager, K., Chemometrie. Karolinum: Praha, 1991; p 156.
110. Procházková, K., Faktory ovlivňující elektrochemickou oxidaci m-kresolu na borem dopované diamantové elektrodě. Univerzita Karlova, Praha, 2016.
111. Bicker, J.; Fortuna, A.; Alves, G.; Falcao, A., Liquid chromatographic methods for the quantification of catecholamines and their metabolites in several biological samples- A review. *Anal. Chim. Acta* **2013**, *768*, 12-34.